Bakteriophagen und Lysotypie bei Proteus rettgeri

Rosemarie Festl

1982

Aus dem Max von Pettenkofer Institut der Universität
München

Vorstand: Professor Dr. F. Deinhardt

Bakteriophagen und Lysotypie bei Proteus rettgeri

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von
Rosemarie Festl
aus
München
1981

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin

der Universität München

Berichterstatter: Professor Dr. A. Bauernfeind

Mitberichterstatter: Professor Dr. F. Deinhardt

Dekan: Professor Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 14.1.1982

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DISSERTATIONS - UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2809090

Ich bedanke mich bei meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. A.Bauernfeind und bei dem Institutsleiter Herrn Professor Dr. F.Deinhardt für die Themenstellung und die ständige hilfreiche Anleitung.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549025_0023

B A K T E R I O P H A G E N U N D L Y S O T Y P I E
B E I P R O T E U S* R E T T G E R I

I N H A L T

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
	Bedeutung von Proteus rettgeri	
	Bedeutung der Lysotypie	
II.	MATERIAL	4
	1. Bakterienstämme	4
	2. Bakteriophagen	10
	3. Nährmedien	10
	4. Reagenzien	11
	5. Geräte	11
III.	METHODEN	13
	A. Bakterien	13
	1. Konservierung der Stämme	13
	2. Vorkultur von Bakterien	13
	B. Bakteriophagen	13
	1. Phagenisolierung aus Abwasser	13
	2. Gewinnung von temperenten Phagen	15
	3. Phagenanreicherung	16
	4. Phagentitration	17
	5. Aufbewahrung der Typisierphagen	17
	C. Lysotypie	17
	1. Vorversuche zur Optimierung der Methode	17
	2. Technik der Lysotypie	19
	3. Auswertung	20
	D. Elektronenmikroskopie der Hauptgruppenphagen	21

* Jetzt Providenzia rettgeri

Seite

IV. ERGEBNISSE 23

1. Isolierung der Typisierphagen 23

2. Lysotypie 26

V. DISKUSSION 34

1. Bedingungen für Hospitalinfektionen durch Proteus rettgeri

2. Qualitätskriterien einer Typisiermethode angewandt auf das neue Lysotypiesystem für Proteus rettgeri

3. Nachweis von Stammkopien im Proteus rettgeri Kollektiv

3.1. Möglichkeiten der Typidentifizierung bei Proteus rettgeri

3.2. Identische Stämme im Rettgerikollektiv

3.2.1. Retrospektiver Nachweis von Kreuzinfektionen im Münchner Klinikbereich

3.2.2. Typisierbarkeit und Typengrößen bei den Proteus rettgeri Stämmen ohne Stammkopien

3.2.3. Typidentifikation durch Kombination von Typisiermethoden

VI. ZUSAMMENFASSUNG 44

VII. ANHANG: TABELLE 2 45

VIII. ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE DARSTELLUNG DER FÜNF HAUPTGRUPPENPHAGEN 65

IX. LITERATUR 71

T A B E L L E N V E R Z E I C H N I S

		Seite
Tabelle 1:	Typisierphagen	25
Tabelle 2:	Einteilung der Bakterien nach ihren Lysotypen	46-65
Tabelle 3:	Häufigkeit der Haupt- und Subtypen bei allen 343 Bakterienstämmen	30
Tabelle 4:	Typisierbarkeit der Rettgeristämme nach dem Herkunftsort	33
Tabelle 5:	Herkunft der Stämme der häufigsten Typen	37
Tabelle 6:	Kopiestämme im Stammkollektiv	39/40
Tabelle 7:	Häufigkeit der Haupt- und Subtypen nach Ausschluß von Stammkopien	42

I. EINLEITUNG

Vertreter der Spezies Proteus rettgeri sind bewegliche, gramnegative Stäbchen, die sich unter aeroben Bedingungen vermehren (20). Als katabole Leistungen finden sich Indol- und Harnstoffspaltung, Mannit- und Adonitabbau, sowie Wachstum auf Citratnährböden. Nicht befähigt ist Proteus rettgeri zur H_2S-Bildung und Ornithinspaltung (13). Wie die übrigen Proteusarten wird auch Proteus rettgeri in der Flora des menschlichen Darmes Gesunder gefunden (7, 20).

Die Bedeutung der Proteusgruppe für die Medizien liegt darin, daß sie allein oder in Gesellschaft mit anderen Keimen als Erreger von Harn- und Gallenwegsinfektionen, Otitis media und Mastoiditis, seltener von Sepsis und Meningitis vorkommt (16). Proteus rettgeri ist insbesondere Erreger von Harnwegsinfekten (4, 7, 12, 24, 26, 28, 33).

Die Spezies erweist sich häufig als vielfachchemotherapieresistent (18, 25). Dies verschafft ihr in Bereichen starken Antibiotikaeinsatzes einen Selektionsvorteil gegenüber anderen Keimen. Proteus rettgeri muß zu den Hospitalkeimen gezählt werden. Manche Autoren (12) vergleichen Proteus rettgeri in seiner Bedeutung als Erreger nosokomialer Infektionen mit Pseudomonas aeruginosa und Serratia marcescens. Veröffentlichungen der letzten Jahre über Hospitalinfektionen durch Proteus rettgeri zeigen die Aktualität des Problems (3, 7, 11, 12, 19, 21, 23, 26, 28, 33, 34).

Aufdecken und Unterbrechen von Infektketten innerhalb einer Klinik sind die Voraussetzungen für das Zurückdrängen nosokomialer Infektionen. Dazu ist es keineswegs ausreichend nur Gattung (Proteus) und Art (rettgeri) der vom Patienten isolierten Keime zu bestimmen. Für epidemiologische Aussagen ist eine Typdifferenzierung <u>innerhalb der Bakterienart</u> unerläßlich: Präzise Bestimmung des <u>Erregertyps</u> ist Voraussetzung zum Nachweis der Identität von Stämmen, die von verschiedenen Patienten isoliert wurden. Nur das gleichzeitige Auftreten desselben Typs von Proteus rettgeri bei mehreren erkrankten Personen beweist Kreuzinfektionen von Patient zu Patient (exogene Infektion). Erst dann können

gezielt krankenhaushygienische Maßnahmen zur Vermeidung weiterer Streuung der Erreger eingeleitet werden.

Für die Unterteilung einer Spezies sind im Prinzip brauchbar biochemische Leistungen (Synthese von Enzymen, Bakteriozinen) oder strukturelle Merkmale (Antigenität der Oberfläche, Rezeptoren für Bakteriozine oder Bakteriophagen); diese Eigenschaften werden zu Biotypie, Serotypie, Bakteriozinotypie und Lysotypie herangezogen.

Lysotypie, die Typendifferenzierung mit Hilfe von Bakteriophagen, beruht auf der verschiedenen Empfindlichkeit von Bakterienstämmen für eine Gruppe von Bakteriophagen. Die Phagensensitivität der Stämme wird festgelegt durch Oberflächeneigenschaften der Bakterien, die genetisch determiniert sind.

Ein Bakterium ist nur empfindlich für einen Phagen, wenn es einmal einen Phagenrezeptor an der Oberfläche trägt, an den der dazu passende Phage adsorbieren kann. Auf der anderen Seite darf die intrazelluläre Phagenvermehrung nicht durch Restriktionsenzyme oder Repressoren unterdrückt werden. Nur die Stämme einer Bakterienart, die diese Bedingungen erfüllen, sind empfindlich für den Phagen und werden lysiert. Die Lysis der Bakterienzellen zeigt sich in Form von Löchern (Plaques, bakterienfreie Stellen) in einem Bakterienrasen dort, wo sich Phagen befanden.

Testet man die Sensitivität eines Bakterienstammes gegenüber mehreren verschiedenen Phagen (Typisierphagen), so erhält man ein Empfindlichkeitsmuster. Bakterien eines anderen nicht identischen Stammes werden von anderen Phagen des Typisierphagensatzes lysiert, zeigen also ein abweichendes Muster. Die Lysismuster bezeichnet man als Lysotypen. Bakterienstämme, die empfindlich für dieselben Phagen sind, gehören zum gleichen Lysotyp.

Der Grundgedanke der Lysotypie, die Unterscheidung von Bakterienstämmen mit Hilfe von Bakteriophagen, wurde zum erstenmal 1921 von BAIL (29) geäußert. Praktische Anwendung fand die Lysotypie dann 1934 bei MARCUSE, dem es gelang, Isolate von Salmonella typhi mit fünf Phagen in Gruppen zu unterteilen.

Besonders bei den Enterobacteriaceae hat das epidemiologische Interesse die Entwicklung von Lysotypieschemata gefördert. Das klassische Beispiel ist die Typisierung von Salmonella typhi mit Vi-Bakteriophagen nach CRAIGIE, YEN und FELIX (29), die

heute einheitlich durchgeführt wird. Daneben gibt es u.a. Typisierphagensysteme für Salmonella typhimurium, S. paratyphi A und B, Shigella flexneri, Sh. sonnei, Escherichia coli, Klebsiella und Pseudomonas aeruginosa (27, 29). Von großer epidemiologischer Bedeutung ist auch die Lysotypie bei Staphylococcus aureus (2, 10, 29, 31) geworden.

Ziele dieser Arbeit sind,

- ein Lysotypenschema für Proteus rettgeri aufzustellen, um eine effiziente Methode zur Klassifizierung dieser Bakterienart für klinisch-epidemiologische Studien zur Verfügung zu haben,
- retrospektiv epidemiologische Zusammenhänge bei im Münchner Klinikbereich aufgetretenen Proteus rettgeri Infektionen durch Typisierung der isolierten Erregerstämme zu finden.

II. MATERIAL

1. Bakterienstämme:

1.1. Proteus rettgeri der ATCC No. 9918:
1.2. " " BRISTOL:
1.3. " " DENVER:
1.4. " " DÜSSELDORF:
1.5. " " ESSEN:
1.6. " " HONGKONG:
1.7. " " JAPAN:
1.8. " " KIEL:
1.9. " " MÜNCHEN:
1.10. " " WEINGARTEN:
1.11. " " GROSSHADERN:
1.12. " " VARIA:

ad. 1.1.: Proteus rettgeri ATCC: 1 Stamm

NR. 9918

ad. 1.2.: Proteus rettgeri BRISTOL: 11 Stämme

B 1
2
3
4
5
6
8
9
10
11
12

HERKUNFT: M. MISIEK, BRISTOL LABS., BRISTOL

ad. 1.3.: Proteus rettgeri DENVER: 42 Stämme

D	1	D	22
	2		23
	3		24
	4		25
	5		26
	6		27
	7		28
	8		29
	9		30
	10		31
	11		32
	12		33
	13		34
	14		35
	15		36
	16		37
	17		38
	18		39
	19		40
	20		41
	21		42

HERKUNFT: P.B. IANINNI VETERAN, ADMIN. HOSP., DENVER

ad. 1.4.: Proteus rettgeri DÜSSELDORF: 11 Stämme

R	1	R	7
	2		8
	3		9
	4		10
	5		11
	6		

HERKUNFT: P. NAUMANN, INSTITUT FÜR MED. MIKROBIOLOGIE UND VIROLOGIE, DÜSSELDORF

ad. 1.5.: Proteus rettgeri ESSEN: 20 Stämme

E	1	E	11
	2		12
	3		13
	4		14
	5		15
	6		16
	7		17
	8		18
	9		19
	10		20

HERKUNFT: G. LINDENMEIER, INSTITUT FÜR MED. MIKROBIOLOGIE, ESSEN

ad. 1.6.: Proteus rettgeri HONGKONG: 34 Stämme

H	1	H	18
	2		19
	3		20
	4		21
	5		22
	6		23
	7		24
	8		25
	9		26
	10		27
	11		28
	12		29
	13		30
	14		31
	15		32
	16		33
	17		34

HERKUNFT: C.T. HUANG, QUEEN ELISABETH HOSPITAL, HONGKONG
J. ERDMAN, CROSS-INF. REFERENCE LAB., LONDON

ad. 1.7.: Proteus rettgeri JAPAN: 39 Stämme

J	1	J	44
	3		45
	4		46
	5		50
	8		51
	9		52
	10		55
	11		56
	13		57
	14		58
	21		67
	22		68
	23		74
	24		75
	25		86
	32		87
	36		90
	38		91
	42		95
	43		

HERKUNFT: DR. S. NAMIOKA, NATIONAL INSTITUTE OF ANIMAL HEALTH, TOKYO

ad. 1.8.: Proteus rettgeri KIEL: 2 Stämme

K	1
	3

HERKUNFT: C. SIMON, UNIVERSITÄTSKINDERKLINIK, KIEL

ad. 1.9.: Proteus rettgeri MÜNCHEN: 144 Stämme

M 1	M 121	M 195	M 273
5	126	196	274
6	128	198	277
7	129	199	278
8	130	203	280
11	132	206	289
12	133	208	290
17	134	209	293
20	135	210	297
24	137	214	298
25	141	216	307
28	146	218	311
31	147	219	312
33	148	222	313
43	149	223	315
45	151	225	316
46	152	229	317
48	153	230	318
52	155	231	325
57	156	233	343
62	158	235	347
64	161	238	350
66	165	239	351
68	169	242	352
69	170	244	354
72	172	246	355
79	173	248	356
85	174	252	358
86	176	256	359
87	178	261	360
89	179	262	361
96	180	265	362
103	185	266	363
108	187	267	365
116T	188	268	368
117	192	272	375

HERKUNFT: Die Stämme wurden im Münchner Klinikbereich isoliert (April 1968 - Februar 1974)

ad. 1.10.: Proteus rettgeri WEINGARTEN: 36 Stämme

W	1	W	26
	2		27
	3		28
	4		29
	6		30
	7		31
	8		32
	9		33
	11		34
	14		36
	15		37
	16		38
	17		39
	18		41
	19		42
	20		44
	21		45
	23		46

HERKUNFT: H. GRIMM, LABOR DR. GÄRTNER, WEINGARTEN

ad. 1.11.: Proteus rettgeri GROSSHADERN: 2 Stämme

GH	1
	2

HERKUNFT: G. RUCKDESCHEL, KLINIKUM GROSSHADERN, MÜNCHEN

ad. 1.12.: Proteus rettgeri VARIA: 1 Stamm

VARIA

HERKUNFT: V. PREAC-MURSIC, MAX VON PETTENKOFER-INSTITUT; MÜNCHEN

2. Bakteriophagen:

Phage	Wirt
m 64	Prot. rettg. M 64
m 103	Prot. rettg. M 103
m 115	Prot. rettg. M 115
m 116	Prot. rettg. M 116
m 297	Prot. rettg. M 297

Die Phagen stammen aus der Phagensammlung von Prof. Dr. A. Bauernfeind, MAX VON PETTENKOFER-INSTITUT, MÜNCHEN.

3. Medien:

3.1. flüssig:

3.1.1. Tryptone Soya Broth (TSB):
Oxoid Ltd., London
30,0 g auf 1000 ml aqua deion., pH 7,3

3.2. fest:

3.2.1. Softagar: 0,7 %
Bacto Agar, Difco-Laboratories, Detroit
7 g auf 1000 ml aqua deion.

3.2.2. Mueller-Hinton Agar (MHA):

Mueller-Hinton-Broth, Difco-Lab., Detroit	21,0 g
Bacto Agar, Difco-Lab., Detroit	15,0 g

auf 1000 ml aqua deion., pH 7,4

3.2.3. Tryptone Soya Agar (TSA):

Tryptone Soya Broth, Oxoid Ltd., London	30,0 g
Bacto Agar, Difco-Lab., Detroit	15,0 g

auf 1000 ml aqua deion., pH 7,3

3.2.4. Pepton Agar:
Max von Pettenkofer-Institut, München

Pepton e carne trypt. "Merck"	25,0 g
NaCl	3,0 g
K_2HPO_4	2,0 g
Bacto Agar, Difco-Lab., Detroit	20,0 g

auf 1000 ml aqua deion., pH 7,4

3.2.5. Blutbase Agar:
Bacto Blood Agar Base, Difco-Lab., Detroit 40,0 g
auf 1000 ml aqua deion., pH 6,8

4. Reagenzien:

4.1. Chloroform pro analysi, Merck, Darmstadt
4.2. Propanol-(2) pro analysi, Merck, Darmstadt
4.3. Gelatine, Merck, Darmstadt
4.4. Sacharose für Dichtegradientenzentrifugation, Merck, Darmstadt
4.5. Magnesiumsulfat pro analysi, Merck, Darmstadt
4.6. Sacharoselösung: 20 %ig bzw. 5 %ig in Phosphatpuffer 0,06 molar mit 0,01 molar. $MgSO_4$

KH_2PO_4	9,08 g
$Na_2HPO_4 \times 2H_2O$	11,88 g
$MgSO_4 \times 7H_2O$	2,47 g
Sacharose (4.4)	200,00 g (20 %ig)
	50,00 g (5 %ig)

auf 1000 ml aqua deion., pH 6,8

5. Geräte:

5.1. Photometer:
Beckman Colorimeter, Model C, 650 nm

5.2. Inkubator für geschüttelte Flüssigkulturen:
Controlled Environment Incubator Shaker
New Brunswick Scientific Co., Inc.

5.3. Super Mixer:
Lab-Line Instruments, Inc.

5.4. Multipoint Inoculator:
Denley-Tech Ltd.

5.5. Zählgerät:

Model C-100

New Brunswick Scientific Co., Inc.

5.6. Zentrifugen:

5.6.1. ECCO Superior II B: Höchstdrehzahl

5.6.2. WKF, G 50 K

Rotor Nr. 797:	Höchstgeschwindigkeit	max g-Wert	Zentrifugationsgeschwind.	g-Wert
	20000 Upm	48800 x g	8000 Upm	7800 x g

5.6.3. Kontron Ultracentrifuge TGA-65, Tegimenta

Rotor	Höchstgeschwindigkeit	max g-Wert	Zentrifugationsgeschwind.	g-Wert
Typ 60 Ti	60000 Upm	362600 x g	50000 Upm	251800
Typ SW 50.1	50000 Upm	300000 x g	20000 Upm	47900 x g

III. METHODEN

A. BAKTERIEN

1. Konservierung der Stämme:

Die Stämme wurden in Röhrchen mit 3 ml Blutbaseagar (siehe Mat. 3.2.5.) mit Gummistopfenverschluß bei 4° C aufbewahrt. Der Agar wurde durch Einstechen und Ausstreichen auf der leicht schrägen Oberfläche beimpft. Anschließend wurde eine Nacht bei 37° C bebrütet.

2. Vorkultur von Bakterien:

Flüssigkeitskulturen von Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase stellten wir her durch Einimpfen einer Öse einer frischen Oberflächenkultur in 5 ml Nährbouillon (TSB) und Bebrüten bei 37° C bis zur optischen Dichte 1,0; das entspricht etwa 10^9 Koloniebildnern/ml.

B. BAKTERIOPHAGEN

1. Phagenisolierung aus Abwasser:

a. Phagengewinnung:

Die Abwasserproben stammten aus der Kläranlage Großlappen in München.

a.a. 300 ml unbehandeltes Abwasser wurden nach Anwärmen auf 37° C mit 0,36 Gramm = 0,12 % verflüssigter Gelatine versetzt. Anschließend wurde 75 Minuten bei 50000 Upm (251800 x g, s. Mat. 5.6.3., ROTOR Type 60 Ti) zentrifugiert. Nach der halben Zentrifugationszeit senkten wir die Temperatur von 30° C langsam auf eine Endtemperatur bei Rotorstillstand von 18° C. Das Senken der Rotortemperatur bewirkte das Festwerden der Gelatine gegen Ende der Zentrifugation. Die feste Gelatine deckt bereits sedimentierte Bakteriophagen ab und verhindert so eine Rückverteilung in den Überstand beim Abbremsen der Zentrifuge.

Der phagenfreie Überstand wurde bis auf 5 % des Volumens verworfen, das Sediment mit der verbliebenen Flüssigkeit resuspen-

diert. Dies entspricht einer etwa 20-fachen mechanischen Phagenanreicherung.

Zur Bakterieninaktivierung wurde die Abwassersuspension mit Chloroform (10 % des Wasservolumens) versetzt. Da hiermit auch eventuell vorhandene chloroformsensible Bekteriophagen zerstört werden, beschränkte sich das angewandte Verfahren auf chloroformresistente Bakteriophagen.

Im nächsten Schritt, der biologischen Phagenanreicherung, wurde je 1 ml des bakterienfreien Abwassersediments zusammen mit 40 ml TSB als Nährbouillon in einem Seitenarmkolben mit 5 ml einer Flüssigkultur (optische Dichte 0,5) eines potentiellen Wirtes beimpft. Unter Schütteln wurde 8 Stunden bei 37° C bebrütet. Anschließend wurde für weitere 14 Stunden bei 37° C, jedoch ohne Schütteln, bebrütet.

a.b. In einem zweiten Verfahren wurde bakterienfreies, chloroformiertes Abwasser direkt mit Nährmedium und potentiellen Wirten versetzt. In 2 Liter Abwasser kamen 500 ml 5-fach konzentrierte TSB (s. Material 3.1.1.). Von mehreren Rettgeristämmen wurden je 5 x 10^8 Koloniebildner eingeimpft. Das Gemisch wurde weiterbehandelt, wie für das erste Verfahren beschrieben.

b. Phagennachweis und Reinkultur:

Die Vermehrung der Bakteriophagen führt zur Lysis der infizierten Bakterienzellen. Der Zelluntergang wird erkennbar durch eine bakterienfreie Stelle im Bakterienrasen. Diese Löcher, Plaques (20), sind Ausdruck der lytischen Aktivität eines Phagen und dessen Nachkommenschaft. Die Fähigkeit zur Plaquebildung ist charakteristisch für Bakteriophagen. Werden andere Bakterienhemmstoffe (z.B. Antibiotika, Bakteriozine), die nicht in der sensitiven Zelle selbst vermehrt werden, einer Bakteriensuspension beigemischt, ergibt sich beim Plattieren lediglich eine gleichmäßige Wachstumsminderung des Rasens. Plaques im Bakterienrasen beweisen demnach die Existenz von Bakteriophagen.

Um im Abwasser vorhandene Phagen sichtbar zu machen, wurden dem bebrüteten Wasser - Bouillon - Gemisch jeweils 2 ml entnommen, mit Chloroform behandelt und 10 Minuten zentrifugiert (ECCO, SUPERIOR II B). 200 µl des wässrigen Überstandes wurden

mit 100 µl einer Vorkultur (OD 1,0) von Wirtsbakterien in 3 ml flüssigen Softagar einpipettiert, gut gemischt und sofort auf eine MHA-Grundschicht ausgegossen. Am folgenden Tag wurde der Rasen nach Plaques abgesucht.

Da verschiedene Phagentypen einer Abwasserprobe den Anreicherungsstamm als gemeinsamen Wirt haben können, wurden zur Reinkultur der Phagenstämme die Plaques nach morphologischen Kriterien differenziert. Als Unterscheidungsmerkmale dienten Größe, Form, Schärfe der Randbegrenzung, Vorhandensein eines Hofes und Transparenz der Plaques.

Das Aussehen der Plaques wird beeinflußt vom Zustand der Bakterien, der Zusammensetzung des Nährmediums und von physikalischen und genetischen Eigenschaften der Bakteriophagen (1). Da im vorliegenden Experiment die Plaques auf der gleichen Petrischale, mit demselben Wirtsbakterium und Nährmedium miteinander verglichen werden konnten, können weder Bakterienzustand noch Milieufaktoren wesentliche Ursachen von unterscheidbaren Plaques auf einer Platte sein. Unterschiede in der Plaquemorphologie sind demnach auf das Vorhandensein von verschiedenen Bakteriophagen zurückzuführen.

Von jedem morphologischen Typ wurde ein einzeln stehendes Plaque mitsamt dem Softagarblock von der Agargrundschicht abgehoben. Zum Herauslösen der Phagen wurde das Softagarblöckchen in 1 ml TSB kräftig geschüttelt. Nach dem anschließenden Chloroformieren wurden Softagarreste, Bakterien und Chloroform sedimentiert (ECCO SUPERIOR II B, 15 Minuten). Vom Überstand legten wir eine Verdünnungsreihe in Zehnerschritten bis mindestens 10^{-4} an. Je 100 µl jeder Verdünnung wurden mit 100 µl der zugehörigen Bakterienvorkultur (OD 1,0) in 3 ml Softagar vermischt und auf eine MHA Grundagarschicht in Petrischalen ausgegossen. Das Verfahren wiederholten wir so oft, bis aus einem Plaquetyp immer wieder Plaques identischer Morphologie entstanden.

2. Gewinnung von temperenten Bakteriophagen:

Das Freisetzen temperenter Phagen aus lysogenen Proteus rettgeri Stämmen versuchten wir durch Einwirkung ultravioletten Lichtes zu induzieren.

Dazu wurden 7 ml TSB, beimpft mit 50 µl einer Bouillonvorkultur des vermeintlich lysogenen Stammes, in einer offenen Petrischale 3 Minuten einer Ultraviolettlampe exponiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit in Seitarmkolben pipettiert und unter Schütteln 6 Stunden lang bebrütet. Die Kultur wurde chloroformiert und zentrifugiert. Je 100 µl des Überstandes wurden mit 100 µl eines Indikatorstammes (phagenempfindlicher Stamm) mit Softagar zum Phagennachweis (III B 1b) plattiert. Als Indikatorstamm wurden verschiedene Proteus rettgeri Stämme durchgetestet. Die Platten wurden eine Nacht bebrütet. Von dem auf Lysogenität untersuchten Stamm freigesetzte Phagen konnten anhand der Plaques in dem Bakterienrasen erkannt und wie oben dargestellt reinkultiviert werden (29).

3. Phagenanreicherung:

Hier wurde gemäß dem Agar - Schicht - Verfahren nach SWANSTROEM und ADAMS (32) vorgegangen.

Von einem Phagentyp wurden 10 - 20 Plaques einer Schale ausgestochen, in 2 ml TSB kräftig geschüttelt, chloroformiert und abzentrifugiert (ECCO SUPERIOR II B, 15 Minuten). Vom Überstand mit den Bakteriophagen wurden 100 µl zusammen mit 100 µl Vorkultur des Wirtes (= Anreicherungsstamm, optische Dichte 1,0) in 3 ml flüssigen Softagar pipettiert und auf eine MHA-Grundschicht ausgegossen. Für jeden Phagen stellten wir 10 solche Platten her. Bei Klarplaquephagen wurde der Rasen völlig durchlysiert; bei Phagen mit trüben Plaques war nur ein dünner Rasen zu sehen. Eine gleichzeitig angelegte Kontrollplatte mit der gleichen Einsaat des Anreicherungsstammes, aber ohne Phagen, ermöglichte den Vergleich mit dem normalen Rasen.

Die phagenhaltige Softagarschicht wurde abgetragen, die Grundschicht mit 1 ml TSB nachgespült. Der Agar und die Spülbouillon aller 10 Platten wurden in einem Kölbchen gesammelt, chloroformbehandelt, 10 Minuten zum Zerteilen des Agars kräftig geschüttelt und 25 Minuten mit 8000 Upm (s. Mat. 5.6.2.) zentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen, der Überstand, das Lysat, enthielt die Bakteriophagen.

4. Phagentitration:

Zur Bestimmung der Phagenkonzentration wurde das Lysat mit TSB exakt in 10^{-2} Stufen bis 10^{-8} verdünnt. Von jeder Verdünnung wurden genau 100 µl mit 100 µl Wirtsbakterien und Softagar plattiert. Nach Bebrüten bei 37° C über Nacht konnte die Zahl der plaquebildenden Einheiten (pfu = plaque forming units) pro Milliliter ausgezählt und errechnet werden.

5. Aufbewahren der Typisierphagen:

Die konzentrierten Lysate mit den Typisierphagen wurden zur Vermeidung einer Infektion mit Bakterien mit Chloroform versetzt (10 % des Lysatvolumens), das sich in der Röhrchenkuppe absetzte. Da nur chloroformresistente Typisierphagen isoliert wurden, wurde der Phagentiter durch das Chloroformieren nicht merklich gesenkt. Die Lysate bewahrten wir im Kühlschrank bei 4° C auf.

C. LYSOTYPIE

1. Vorversuche zur Optimierung der Methode:

a. Typisiermedium:

Zur Ermittlung des optimalen Typisiermediums wurden alle Proteus rettgeri Phagen auf MHA, TSA und Peptonagar titriert. Das Volumen des festen Nährmediums wurde konstant bei 15 Milliliter gehalten.

Daneben wurde auch die optimale Menge der Softagarschicht durch Austesten verschiedener Volumina (2, 2.5, 3 ml) ermittelt. Wie unter "Technik der Lysotypie" (III C 2) beschrieben, wurden mit einem Multipoint-Inoculator aus verschiedenen Verdünnungen Bakteriophagen auf Rasen ihrer Anreicherungsstämme getropft.

Verglichen wurde der Einfluß der Softagarmenge auf den Lysisgrad.

b. Bakterienrasen:

Die Bakterienrasen zum Typisieren stellten wir auf zweierlei Art her:

Einmal spatelten wir 100 Mikroliter einer Übernachtvorkultur des zu typisierenden Bakterienstammes (optische Dichte 1,0) direkt auf 15 ml Grundnährboden aus. Dabei achteten wir besonders auf möglichst gleichmäßige Verteilung der Bakteriensuspension.

Daneben legten wir Bakterienrasen durch Plattieren mit Softagar an: 100 µl der Vorkultur (opt. Dichte 1,0) wurden in 2,5 ml Softagar nach gutem Mischen auf die Platte mit Grundnährboden ausgegossen.

c. Typisierphagen

Einstellung der kritischen Testverdünnung:

Die kritische Testverdünnung (KTV) ist definiert als "die höchste Verdünnungsstufe der Verdünnungsreihe einer Bakteriophagensuspension, mit der auf dem Vermehrungsstamm noch eine konfluierende Lysis* erzeugt wird" (29). Die KTV ist abhängig von der Größe der Plagues.

Zur Ermittlung der KTV eines Typisierphagen stellten wir eine Verdünnungsreihe in 10^{-1} Schritten bis 10^{-6} her. Aus jeder Verdünnungsstufe wurden Bakteriophagen mit dem Multipoint - Inoculator auf einen Rasen des Anreicherungsstammes aufgetropft. Nach Antrocknen der Tropfen wurde eine Nacht bei 37° C bebrütet. Die höchste Verdünnungsstufe, bei der noch der gesamte Tropfenbereich durchlysiert war, wurde definitionsgemäß als kritische Testverdünnung festgelegt.

Einstellung der Routine-Testverdünnung:

Die Routine-Testverdünnung (RTV) ist "die Verdünnung, bei der sich Stämme abgestufter, konstanter Phagenempfindlichkeit noch sicher und reproduzierbar nach Art und Stärke der Phagenreaktion unterscheiden lassen." (29)

Zur Ermittlung der RTV typisierten wir Proteus rettgeri Stämme mit allen Phagen nach der in "Technik der Lysotypie" (III C 2) beschriebenen Methode, wobei jeder Phage in zwei Verdünnungen, KTV und der hundertfachen KTV, aufgetropft wurde. Nach der De-

* konfluierende Lysis = ineinanderfließende Plaques; der gesamte Tropfenbereich ist durchlysiert.

finition war die Verdünnung, die verschiedene Bakterienstämme in ihrer Phagenempfindlichkeit noch unterscheiden ließ, die RTV.

d. Sterilisieren der Multipoint Ösen:

Um Verschleppen der Bakterien von einer Typisierplatte in die Phagenbehälter und auf die nächste Typisierplatte zu vermeiden, sterilisierten wir die Tropfösen jeweils zwischen der Beimpfung von zwei Platten.

Sie wurden dazu in konzentrierten Isopropylalkohol getaucht und anschließend mit der Bunsenbrennerflamme entzündet. Die Sicherheit dieses Verfahrens prüften wir durch Antupfen der Ösen mit den Phagensuspensionen auf eine sterile Testplatte. Die notwendige Mindesteintauchzeit in den Alkohol wurde durch Variieren der Alkoholeinwirkung auf die Bakterien (60, 30, 15 und 1 Sekunde) mit sofort anschließendem Abflammen ausprobiert.

2. Technik der Lysotypie:

Zur Lyotypie legten wir einen Rasen des zu typisierenden Bakterienstammes an. Dieser wurde mit den Bakteriophagen betropft.

Die Bakterienrasen stellten wir durch Einpipettieren und Mischen von 100 µl einer Vorkultur mit optischer Dichte 1,0 des zu typisierenden Stammes in 2,5 ml Softagar her. Der Weichagar wurde auf einer Petrischale mit 15 ml MHA ausgegossen. Zu jeder Typisierplatte legten wir eine identische Kontrollplatte an. Nach Festwerden des Agars wurden die Typisierphagen aufgebracht. Das dazu verwendete Typisiergerät, der Multipoint - Inoculator von DENLEY (s. Mat. 5.4.),war mit einem Satz von 21 Ösen und den dazugehörigen 21 Phagenbehältern bestückt. Die Typisierphagen wurden sowohl in der KTV und 100 x KTV aufgetropft. Um gleiche Ausgangsbedingungen zu gewährleisten, wurden alle Phagenbecher mit 0,9 ml Phagenlösung gefüllt.

Sterile Ösen tauchen in die Phagenreservoire und führen eine bestimmt Menge Flüssigkeit mit. Dann wird der Satz mit den Phagenreservoiren mechanisch wegbewegt und eine Petrischale mit dem Bakterienrasen unter die Ösen gebracht. Die Ösen senken sich jetzt auf die Plattenoberfläche und geben die Phagentropfen ab. Dabei darf die Softagaroberfläche nicht verletzt werden, um

mechanisch verursachte Löcher im Rasen, die Plaques vortäuschen, zu vermeiden. Anschließend werden die Phagenbecher wieder in die Ausgangsstellung unter die Ösen zurückbewegt.

Die Ösen werden nach jeder Beimpfung einer Platte sterilisiert. Dazu werden sie eine Sekunde in konzentrierten Isopropylalkohol getaucht und abgeflammt.

Nach kurzer Abkühlzeit kann der Arbeitsvorgang für die nächste Typisierplatte wiederholt werden.

Die beimpften Petrischalen bleiben bis zum Antrocknen der aufgebrachten Tropfen geöffnet stehen. Danach wird 12 Stunden bei 37° C bebrütet und ausgewertet.

3. Auswertung:

Die bebrüteten Platten wurden mit Hilfe eines Zählgerätes (s. Mat. 5.5.) im Gegenlicht bei Lupenvergrößerung abgelesen. Je nach der Sensibilität der untersuchten Bakterienstämme für die Typisierphagen ergaben sich im Bereich der Phagentropfen Übergänge von vollständiger Lysis (klares Loch im Bakterienrasen mit Tropfendurchmesser) bis zum negativen Ausfall der Reaktion, das heißt unbeeinflußtes Bakterienwachstum auch im Phagentropfenbereich. Der Grad der Lysis ist abhängig von der Phagenart, der Phagenverdünnung, dem Bakterienstamm und der Zusammensetzung des Typisiermediums (29).

Bis auf die Wahl des zu typisierenden Bakterienstammes waren diese Faktoren festgelegt. Damit waren die Voraussetzungen für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gegeben.

Um Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurde die bei anderen Phagentypisiersystemen verwendete Terminologie für die Beurteilung der Lysegrade mit geringfügigen Änderungen übernommen.

CL = konfluierende oder vollständige Lysis
<CL = nicht vollständige Lysis
OL = opake Lysis (konfluierende trübe Plaques)
— = keine Lysis

bei einzeln stehenden Plaques verwendeten wir

+++	für mehr als 50 Plaques
++	für mehr als 10 Plaques
+	für mehr als 5 Plaques
Zahl	für weniger als 5 Plaques

Plaquegröße:

m = sehr klein, mit der Lupe erkennbar (minute)
s = klein, 0,1 - 0,2 mm Durchmesser (small)
n = mittel, 0,2 - 0,5 mm Durchmesser (normal)
l = groß, 0,5 - 1 mm Durchmesser (large)
g = sehr groß, >1 mm Durchmesser (great)

(verändert nach ZIESCHÉ, K. und RISCHE, H. in 29)

Die Lysotypzuordnung orientiert sich jedoch nicht primär an quantitativen Unterschieden im Lysisgrad, sondern vorwiegend nach der Qualität der einzelnen Phagenreaktionen mit dem Untersuchungsstamm. Wir differenzierten in positiv (= Lysis durch Phagenvermehrung) und negativ (= keine Lysis, der Bakterienstamm gehört nicht in den Wirtsbereich des betreffenden Phagen). Als eindeutig positiv wurde jede Reaktion gewertet, die nach angegebener Terminologie mindestens ++ erreichte, unabhängig von der Größe der Plaques.

D. ELEKTRONENMIKROSKOPIE DER HAUPTGRUPPENPHAGEN

Die fünf Hauptgruppenphagen -b1, m 103, m 115, m 116, d 15a- weisen einen auffallend breiten Wirtsbereich für die Isolate von Proteus rettgeri auf. Sie sind somit besonders geeignet für diese Spezies. Aus diesem Grund und zur besseren Charakterisierung wurde die Morphologie dieser Phagen elektronenoptisch erfaßt.

Zur Elektronenmikroskopie reinigten wir die Phagenlysate in einem Sacharosegradienten. In einem Zentrifugenrohr befanden

sich 4.2 ml einer Sacharoselösung, s. Mat. 4.6., die ein kontinuierliches Konzentrationsgefälle von 20 % in der Kuppe bis 5 % am anderen Ende des Rohres aufwiesen. Auf diesen Gradienten wurden am 5 %-Ende vorsichtig 200 µl des konzentrierten Phagenlysats geschichtet. Für jede Phagenart wurden zwei Gradienten präpariert. Die Rohre wurden ultrazentrifugiert (s. Material 5.6.3. Rotor Type SW 50.1), so daß die Teilchen des daraufgeschichteten Lysates sich nach Größe auftrennten und in verschiedenen Schichten des Sacharosegradienten fanden. Es wurde 55 Minuten mit 20000 Upm (47900 x g) zentrifugiert. Anschließend fraktionierten wir den Rohrinhalt durch Einstechen einer Nadel in die Rohrkuppe und Abtropfenlassen des Inhaltes. Dabei wurde von oben mit Paraffinöl der notwendige Druck ausgeübt. Je 20 Tropfen ergaben eine Fraktion. Jede Fraktion wurde anschließend titriert (III B 4). Als Ausnahme ist der Phage m 116 anzuführen, der in einem analogen Verfahren gereinigt wurde, wobei die Zentrifugationszeit jedoch 65 Minuten betrug.

Für jede Phagenart sammelten wir die zwei bis drei (bei b1) Fraktionen mit dem höchsten Phagentiter von beiden Zentrifugenrohren.

Diese gereinigte Phagensuspension verwendeten wir dann zur Elektronenmikroskopie.

Wir verfertigten Negativaufnahmen von den Phagen bei einer elektronenoptischen Vergrößerung von 100000-fach. Dazu wurde direkt mit dem folienbeschichteten Elektronenmikroskop-Netz ein Tropfen von der Oberfläche der aufgeschüttelten gereinigten Phagensuspension abgenommen, ungefähr 5 Sekunden angetrocknet und die restliche Flüssigkeit mit einem Filterpapier abgesaugt. Anschließend wurde mit Phosphorwolframsäure kontrastiert, indem wiederum direkt mit dem Netz ein Tropfen Phosphorwolframsäure aufgenommen, kurze Zeit angetrocknet und abgesaugt wurde. Das völlig trockene Netz konnte im Elektronenmikroskop nach Phagen abgesucht werden. Von wiederholt gesehenen phagentypischen Partikeln fertigten wir Negativbilder an. Der Vergrößerungsfaktor beim Positiventwickeln betrug 3,5 x. Die Abbildungen 1, 2, 3, 4 und 5 zeigen die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der fünf Hauptgruppenphagen bei einer 350000-fachen Gesamtvergrößerung.

IV. ERGEBNISSE

1. Isolierung von Typisierphagen

Der erste Teil der Arbeit umfaßte die Suche nach Phagen, die Proteus rettgeri Stämme lysieren können. Wir gingen davon aus, daß eine weite Streuung der Herkunft der eingesetzten Wirtsbakterien Voraussetzung für ein nicht nur regional verwendbares Typisierschema ist. Deshalb wählten wir von den Rettgeristammkollektiven unterschiedlicher geographischer Herkunft jeweils einige Vertreter aus. Dabei bemühten wir uns anhand bekannter Merkmale (biochemische Leistungen, Bakteriozinbildung und -empfindlichkeit) Kopien auszuschließen. Für die so ausgesuchten Stämme versuchten wir Bakteriophagen zu finden.

a. Phagengewinnung aus Abwasser:

Aus dem Abwasser konnten wir insgesamt 10 Bakteriophagen isolieren, die für das Typisierschema von Bedeutung sind (TAB. 1 S. 25). Sie wurden nach den zugehörigen Anreicherungsstämmen benannt, jedoch zum Unterschied dazu mit kleinen Ortsbuchstaben. Die Methodik der Gewinnung und Anreicherung wurde in III, B.1. beschrieben.

b. Phagengewinnung aus lysogenen Bakterien:

Für Bakterienstämme, zu welchen keine Phagen aus dem Abwasser isoliert werden konnten, wurde versucht, Bakteriophagen aus lysogenen Proteus rettgeri Stämmen zu bekommen.

Für die Stämme der Hongkong-Gruppe war die Abwasserphagensuche wenig ergiebig. Es waren keine Hinweise auf Lysogenität einzelner Stämme vorhanden, so daß nach temperenten Phagen durch willkürliche Auswahl und Kombination potentieller Phagenträger und Indikatorstämme aus der Hongkong-Gruppe gesucht wurde. Um die Wahrscheinlichkeit der Phagenfreisetzung zu erhöhen, induzierten wir vermeintliche Phagenträger 3 Minuten mit UV-Licht.

Lysogenität wurde nachgewiesen bei H7, H13, H18, H25, H30, H31, H32 und H33. Die freigewordenen Phagen aus diesen Stämmen erzeugten Plaques insbesondere auf den vier Hongkong-Indikator-

stämmen H2, H6, H11 und H24. Die Plaques, die die Phagen von H33 auf H11 bildeten, wurden vermehrt. Da der erreichbare Titer zu niedrig war, wurde der Anreicherungsstamm gewechselt. Die Phagen wurden weiter auf H24 rein isoliert und angereichert. Sie erhielten die Bezeichnung h24/H33 (TAB. 1 S. 25).

c. Typisierphagenauswahl:

Mit der Unter "Technik der Lysotypie" (III C.2.) beschriebenen Methode typisierten wir alle 343 Proteus rettgeri Stämme mit allen bis dahin gefundenen Proteus rettgeri Phagen, um die geeigneten Typisierphagen herauszufinden und Lücken der Phagenempfindlichkeit bei den Rettgeristämmen zu ermitteln. Nach weiterer auf diese Lücken gerichteter Phagensuche schlossen wir einen zweiten Typisierdurchgang mit einem zusätzlichen Phagensatz an. Beide Durchgänge entschieden über die Auswahl der Typisierphagen aus dem Phagenangebot und über die Lysotypzuordnung der Proteus rettgeri Stämme.

In Tabelle 1 (S. 25) sind die 16 Bakteriophagen aufgelistet, die in das Typisierschema eingegangen sind. Dafür wurden solche Phagen ausgewählt, die im Titer über Monate stabil blieben, deutliche Lysisreaktionen mit den Bakterien zeigten und sich voneinander im Wirtsbereich möglichst weit unterschieden.

Die 16 Typisierphagen stammten aus folgenden Quellen:

- 10 Isolierungen aus Abwasser (s. Meth. III B 1)
- 1 temperenter Phage eines lysogenen Proteus rettgeri Stammes
- 5 aus der Phagensammlung von A. Bauernfeind

Nomenklatur der Typisierphagen:

Aus dem Abwasser isolierte Wildphagen tragen den Anfangsbuchstaben des Herkunftsortes vom Anreicherungsstamm, jedoch - um sie vom Bakterienstamm unterscheiden zu können - mit kleinem Buchstaben. Der temperente Phage erhielt zusätzlich die Abkürzung des lysogenen Elternstammes (z.B. h24/H33 bedeutet: H24 ist Vermehrungsstamm, H33 ist lysogener Elternstamm). Griechische Buchstaben verwendeten wir zur Differenzierung mehrerer Phagen ein und desselben Bakterienstammes.

Aus Tabelle 1 (S. 25) können weiterhin Herkunft, Titer und Testverdünnungen der Typsierphagen entnommen werden.

Tabelle 1: TYPISIERPHAGEN

Phage	Herkunft	Titer $\frac{pfu}{ml}$	KTV *) x Titer
b 1	Abwasser	$2,1 \times 10^{10}$	10^{-3}
b 2	Abwasser	$1,0 \times 10^{8}$	10^{-3}
d 15a	Abwasser	$6,0 \times 10^{9}$	10^{-2}
e 2	Abwasser	$1,0 \times 10^{10}$	10^{-3}
e 8	Abwasser	$2,2 \times 10^{8}$	10^{-2}
e 11a	Abwasser	$1,0 \times 10^{8}$	10^{-2}
e 11ß	Abwasser	$3,0 \times 10^{7}$	10^{-2}
h24/H33	temperent in H33	$1,8 \times 10^{9}$	10^{-2}
j 10	Abwasser	$8,0 \times 10^{9}$	10^{-3}
j 38a	Abwasser	$1,0 \times 10^{11}$	10^{-4}
j 38ß	Abwasser	$3,4 \times 10^{10}$	10^{-2}
m 64	Ph-samml.	$4,0 \times 10^{9}$	10^{-4}
m 103	Ph-samml.	$3,0 \times 10^{9}$	10^{-3}
m 115	Ph-samml.	$6,0 \times 10^{9}$	10^{-3}
m 116	Ph-samml.	$3,3 \times 10^{9}$	10^{-3}
m 297	Ph-samml.	$1,5 \times 10^{9}$	10^{-2}

*) $RTV = KTV \times 10^{2}$

2. Lysotypie

a. Standardisierung der Methodik:

Die Morphologie von Plaques ist u.a. abhängig vom Milieu, in dem sich Phage und Bakterie befinden. Die Adsorbtion eines Phagen an eine Bakterienzelle erfordert die Mithilfe von Ionen und Cofaktoren aus der Umgebung (1). Aus diesem Grund beeinflußt die Zusammensetzung des Nährbodens das Aussehen der Plaques. Um das am besten geeignete Milieu herauszufinden, testeten wir drei verschieden zusammengesetzte Nährböden. Als Eignungskriterium dienten Größe und Deutlichkeit der Plaques.

Im einzelnen ergab sich: Deutliche Plaques aller Phagen auf Müller-Hinton Nährboden. Auf TSA zwar größere Plaques für j38ß, dafür waren Plaques anderer Phagen (j10) schlechter erkennbar, ähnlich wie bei Peptonagar. Wir entschieden uns daher für Müller-Hinton Agar als Typisiernährboden und ein einheitliches Volumen der Grundagarschicht von 15 ml.

Die geeignetste Softagarmenge, die für die Bakterienrasen verwendet werden sollte, war ebenfalls zu ermitteln. Die Plaquezahl im Tropfenbereich nahm mit steigender Menge (von 2 über 2,5 nach 3 ml) gering ab. Da bei dickerer Softagarschicht die Bakterien weniger dicht stehen, sind die Wege der Phagen zu ihren Wirten länger, so daß ein Adsorbieren z.T. erst später stattfinden kann, nachdem die Bakterien bereits in die stationäre Wachstumsphase eingetreten sind. Dadurch nimmt die Plaquegröße ab. Demnach wäre ein möglichst geringes Weichagarvolumen optimal.

Das 2 ml Volumen bereitete jedoch Schwierigkeiten bei der gleichmäßigen Verteilung auf der Grundagarschicht. Deshalb wählten wir 2,5 ml als Standardsoftagarvolumen.

Die notwendige Reproduzierbarkeit des Ergebnisses setzt gleichmäßigen Rasen über die ganze Nährbodenoberfläche voraus.

Da mit der Spateltechnik keine hinreichende Gleichmäßigkeit des Bakterienrasens erreicht werden konnte, wurden die Typisierplatten durch Plattieren mit Softagar hergestellt. Die Einsaat an Wirtsbakterien betrug 1×10^8 Keime pro Platte aus einer Flüssigkultur (III A 2).

Im Gegensatz zur immer gleichgehaltenen Bakteriensaat wurde die Konzentration der Typisierphagen individuell eingestellt.

Für die hier untersuchten 343 Stämme von Proteus rettgeri war die hundertfache KTV noch genügend differenzierend zwischen verschieden sensitiven Stämmen. Für die Lysotypie von Proteus rettgeri tropften wir deshalb die Typisierphagen in der hundertfachen KTV auf.

Da eine brauchbare Typisierung von Bakterienstämmen allgemeingültig und reproduzierbar sein muß, d.h., daß die Durchführung an verschiedenen Orten und zu verschiedenen Zeiten dasselbe Ergebnis zu erbringen hat, haben wir die von uns als optimal befundenen Testbedingungen strikt eingehalten.

Zusammengefaßt waren dies:

Typisiermedium:	15 ml Müller-Hinton Agar (1,5 %)
Softagar:	2,5 ml, 0,7 %ig
Bakterieneinsaat:	100 µl einer Vorkultur des zu typisierenden Stammes mit opt. Dichte 1,0 (10^8 Keime)
Bakteriophagen:	RTV = 100 x KTV jeder Phagenbecher des Typisiergerätes enthält 0,9 ml
Bebrütung:	12 Stunden, 37° C

b. Sterilisation der Multipoint Ösen:

Beim Absetzen der Phagentropfen auf die Typisierplatte berühren die Ösen des Multipoint - Inoculators die Softagaroberfläche und werden mit Bakterien kontaminiert. Würde unmittelbar danach die nächste Platte betropft werden, so würden Bakterien in die Phagenbehälter verschleppt und mit den Ösen auf die nächste Typisierplatte transferiert werden. Sind die direkt verschleppten Bakterien phagenresistent, so können sie sich auf der nächsten Typisierplatte im Phagentropfenbereich vermehren und dadurch eine Lysisreaktion auf der nächsten Platte überdecken. Aus diesem Grund mußte für eine verläßliche Sterilisation der Ösen nach Beimpfung jeder einzelnen Platte gesorgt werden. Die Ösen wurden dazu in konzentrierten Isopropylalkohol ge-

taucht, entzündet und anschließend auf überlebende Bakterien untersucht. Ein ausreichender Sterilisationseffekt - keine Kolonienbildner auf einer mit den Ösen berührten Testplatte - ergab sich schon bei einer Sekunde Eintauchzeit in Alkohol und sofortigem Abflammen.

c. Typisierergebnis:

Typisierphageneinteilung

Die Reaktionen der 16 Typisierphagen mit den 343 Proteus rettgeri Stämmen ließen sich in ein Typisierschema ordnen. Dabei wurde nur die Qualität - Phagenempfindlichkeit oder Phagenresistenz - und nicht die Stärke der Lysis berücksichtigt.

Fünf Bakteriophagen - b1, m103, m115, m116, d15a - zeichneten sich durch einen besonders großen Wirtsbereich aus. Mit diesen fünf Phagen konnten von den 343 getesteten Rettgeristämmen 298 (86,9 %) typisiert werden, d.h., sie wurden von wenigstens einem der fünf Phagen lysiert. Dies veranlaßte uns zu einer Einteilung der Proteus rettgeri Stämme in H a u p t g r u p p e n entsprechenden Lysismustern mit diesen fünf Bakteriophagen.

Die übrigen elf Typisierphagen unterteilten die Hauptgruppen in U n t e r g r u p p e n . Sie erhöhten dadurch das Auflösungsvermögen des Typisierschemas.

Außerdem ließen die Nebengruppenphagen eine Typisierung von sechs weiteren Stämmen zu, die nicht für die Hauptgruppenphagen empfindlich waren. Damit erhöhte sich die Typisierbarkeit der Proteus rettgeri Stämme auf 88,6 %.

Lysotypeneinteilung

Die Phagentypisierung der 343 Proteus rettgeri Stämme ergab die in den Tabellen 2 und 3 dargestellte Differenzierung der Lysotypen.

Erläuterung zu Tabelle 2 (ANHANG, VII):

In Tabelle 2 sind die 343 Bakterienstämme nach ihrem Lysotyp unterteilt aufgeführt.

Typbezeichnung: Die Ziffern besagen, welche der Hauptgruppenphagen positiv reagieren. Die kleinen Buchstaben geben an, wel-

ohne der Nebengruppenphagen lysieren können. Zur Vereinfachung wurden die Subtypbezeichnungen in der letzten Spalte mit Großbuchstaben codiert.

Erläuterung zu Tabelle 3 (S. 30)

Tabelle 3 enthält die Hauptlysotypen mit den zugehörigen Stammzahlen, absolut und in Prozenten, sowie die Verteilung der Stämme auf die Untergruppen.

Tabelle 3: HÄUFIGKEIT DER HAUPT- UND SUBTYPEN BEI ALLEN 343 BAKTERIENSTÄMMEN

HAUPTTYP	STAMMZAHL	% v. 343	STAMMZAHLEN DER SUBTYPEN														
			A	B	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	O	P
0	6	1,75	1	1	2	1	1										
1	50	14,58	12	16	3	1	1	1	2	2	2	2	2	1	1	1	3
2	57	16,62	53	1	3												
4	3	0,88	3														
5	17	4,96	13	1	1	1	1										
12	5	1,46	2	1	1	1											
15	31	9,04	16	1	1	3	1	1	1	2	1	1	1	1	1		
34	3	0,88	3														
14	2	0,58	1	1													
24	1	0,29	1														
125	14	4,08	1	2	2	2	1	1	1	1	2	1					
134	2	0,58	2														
135	1	0,29	1														
145	4	1,16	2	2													
234	51	14,87	48	2	1												
1234	14	4,08	2	1	2	1	2	2	3	1							
1235	1	0,29	1														
1245	1	0,29	1														
1345	5	1,46	1	1	1	1	1										
2345	1	0,29	1														
12345	35	10,20	1	23	1	1	2	2	1	2	1	1					
	304	88,63															
nicht typ.	39	11,37															
	343	100,00															

Typisierbarkeit

Mit allen 16 Typisierphagen konnten 304 (88,6 %) von 343 untersuchten Proteus rettgeri Stämmen typisiert werden. Mit den fünf Hauptgruppenphagen erreichten wir eine Typisierbarkeit von 86,9 %, da 6 (1,75 %) der Rettgeristämme nur von Nebengruppenphagen lysiert wurden.

Die 343 Bakterienstämme konnten 21 Hauptgruppen zugeordnet werden. Bei gleichzeitiger Untergruppierung ergaben sich 93 verschiedene Typen.

Die drei häufigsten Lysotypen waren:

Lysotyp	Stämme	% von 343
2A:	53	15,5 %
234A:	48	13,99 %
12345B:	23	6,7 %

In Tabelle 4 ist die Typisierbarkeit der Rettgeristämme nach dem Herkunftsort geordnet dargestellt (S. 33).

Da der Großteil der getesteten Stämme in Münchner Kliniken isoliert worden war (144 von 343, 42 %) und die Typisierphagen ebenfalls aus Münchner Abwasser gewonnen worden waren, erschien es sinnvoll, die Typisierbarkeit auch nach Herkunft der Stämme aufzulisten, um einen möglichen Zusammenhang zwischen Isolierungsort von Phagen und Bakterien und der Typisierbarkeit erkennen zu können.

Betrachtete man nur die 144 Münchner Rettgeristämme, so ergaben sich folgende Zahlen:

Die fünf Hauptgruppenphagen ermöglichten eine Lysotypzuordnung bei 130 (90,3 %) Stämmen. Nichttypisierbar waren 14 (9,7 %) Stämme (Tabelle 4, S. 33).

Die Münchner Proteus rettgeri Stämme wurden in 11 Haupttypen eingeteilt. Die häufigsten Typen waren:

Lysotyp	Stämme	% von 144
234A:	47	32,6 %
2A:	43	29,9 %
12345B:	22	15,3 %

Die Angaben in Prozent beziehen sich auf 144 Münchner Stämme.

Für die übrigen 199 Proteus rettgeri Stämme, die als weltweite Vertreter dieser Bakterienart angesehen werden können, galten folgende Zahlen:

Die fünf Hauptgruppenphagen erfaßten 168 (84,4 %) Stämme, und alle Phagen 174 (87,4 %). 25 (12,6 %) Stämme waren nicht typisierbar. Es ließen sich 20 Haupttypen einteilen.

Die häufigsten waren:

Lysotyp	Stämme	% von 199
1B:	16	8,0 %
15A:	15	7,5 %

Die Angaben in Prozent beziehen sich auf 199 Rettgeristämme.

Es ließ sich demnach keine eindeutige Bevorzugung der Münchner Rettgeristämme hinsichtlich der Typisierbarkeit mit den in München isolierten Phagen gegenüber den Proteus rettgeri Stämmen aus anderen geographischen Regionen feststellen. Unterschiede bestanden jedoch in der Typenverteilung.

Tabelle 4: TYPISIERBARKEIT DER BAKTERIENSTÄMME NACH DEM HERKUNFTSORT

Prot.rett.	Stamm-zahl	typisierbar m. Haupttyp-phagen	*) %	typisierbar m. allen 16 Phagen	%	nicht typisierbar	%
BRISTOL	11	9	81,8	9	81,8	2	18,2
DENVER	42	31	73,8	31	73,8	11	26,2
ESSEN	20	20	100,0	20	100,0	-	-
GH, VARIA	3	1	33,3	1	33,3	2	66,7
HONGKONG	34	29	85,3	32	94,1	2	5,9
JAPAN	39	38	97,4	38	97,4	1	2,6
KIEL	2	1	50,0	1	50,0	1	50,0
MÜNCHEN	144	130	90,3	130	90,3	14	9,7
DÜSSELDORF	11	9	81,8	11	100,0	-	-
WEINGARTEN	36	29	80,6	30	83,3	6	16,7
ATCC	1	1	100,0	1	100,0	-	-
	343	298		304		39	

*) Prozentuale Angabe bezogen auf die jeweilige Stammzahl

V. DISKUSSION

Proteus rettgeri ist bei Harnwegsinfektionen stationärer Krankenhauspatienten aufgrund seiner Vielfachchemotherapieresistenz ein therapeutisches Problem.

Das Hervortreten dieser früher selten als Erreger von Infektionen beim Menschen gefundenen Spezies wird begünstigt durch das Zusammentreffen verschiedener Voraussetzungen, wie sie offenbar erst unter den Gegebenheiten der modernen Intensivmedizin häufiger realisiert sind.

Eine Hauptursache sind die meist schwerkranken und abwehrgeschwächten Patienten selbst, die einen idealen Wirt für opportunistische bakterielle Erreger darstellen. Besonders gefährdet sind Patienten mit einer Vorschädigung im Bereich des Harntraktes, Traumen bei Verkehrsunfällen oder Operationen. Harnwegsobstruktionen durch Steine, Strikturen, Fremdkörper, Divertikel und ähnliche Ursachen führen zu Harnabflußstörungen (17). Im gestauten Harn finden viele Enterobacteriaceae bei optimaler Wachstumstemperatur günstige Bedingungen für schnelle Proliferation.

Ein anderer Grund ist die Widerstandsfähigkeit von Proteus rettgeri gegenüber Antibiotika. Die heute in vielen Kliniken übliche chemotherapeutische Infektionsprophylaxe kann eine Selektion resistenter Erreger verursachen.

Eine weitere Ursache ist die iatrogene Vorschädigung der Harnwege des Patienten, die einer Besiedelung mit pathogenen Keimen den Boden bereitet. Hierher gehören Instrumentierungen, wie Blasenkatheterlegen, Dauerkatheter oder Blasenspiegelungen (Cystoskopie). Auch bei sorgfältigem, sauberem Einführen von Instrumenten in die Harnröhre können Keime aus dem unsterilen vorderen Teil der Urethra in die Tiefe verschleppt werden und dort zu Infekten führen (22). Dauerkatheter mit drei bis vier Tagen Liegezeit haben in praktisch 100 % der Fälle eine Infektion der Harnwege zur Folge (22, 24).

Ein weiterer, wichtiger Punkt für das Zustandekommen von Hospitalinfektionen ist die Übertragung zwischen den Patienten gerade unter den besonderen Verhältnissen in einer Klinik. Die Erregerverbreitung kann dabei durch direkten Kontakt der Personen

miteinander oder über infizierte Gegenstände vonstatten gehen. Als Keimreservoir erwiesen sich Urinflaschen, Bettpfannen, Fieberthermometer und ungenügend sterilisierte Instrumente (14, 26, 34). Auch an den Händen von Ärzten und Pflegepersonal wurden die Erreger nachgewiesen. Ihnen kommt eine sehr wichtige Überträgerrolle zu (30).

Die genannten Bedingungen findet man bevorzugt in Krankenhäusern. Deshalb bereiten dort auch früher für harmlos gehaltene Keime (neben Proteus rettgeri auch Pseudomonas aeruginosa und Serratia marcescens, 29) große Schwierigkeiten. Diesen Erregern ist mehr Aufmerksamkeit zuzuwenden, insbesondere von krankenhaushygienischer und epidemiologischer Seite. Vorrangiges Ziel muß dabei sein, Kreuzinfektionen schnell zu erkennen, die Infektkette von Patient zu Patient bis zur Erregerquelle zurückzuverfolgen und den Übertragungsmodus aufzuklären. Erst dann können die Ursachen gezielt beseitigt und nosokomiale Infektionen dieser Art weiter reduziert werden.

Epidemiologische Zusammenhänge zwischen Infektionen bei verschiedenen Patienten werden deutlich durch Typ-Identifizierung der verursachenden Bakterienstämme. Dazu ist eine Stammdifferenzierung unterhalb der Bakterienart (z.B. Proteus rettgeri) unerläßlich. Diese Typcharakterisierung wird umso spezifischer, je größer das Auflösungsvermögen der Klassifizierungsmethode ist, mit der eine Unterteilung der Art vorgenommen wird und je mehr verschiedene voneinander unabhängige Typisierungsmerkmale dafür herangezogen werden.

Die Qualität eines Unterteilungsprinzips ist danach zu beurteilen, wie gut es in einem vorhandenen Stammaterial Kopien der Stämme als solche erkennen läßt, d.h., dem gleichen Typ zuordnet. Wir haben das Phagentypisierschema für Proteus rettgeri nach solchen Gesichtspunkten aufgebaut.

Mit unserem für die Lysotypie eingesetzten Phagensatz war es möglich, 88,6 % der untersuchten Proteus rettgeri Stämme zu erfassen. Berücksichtigt man die Herkunft der Stämme aus weit voneinander entfernten Regionen der Welt, so kann man erwarten, daß auch andere Proteus rettgeri Stämme aus bisher nicht untersuchten geographischen Gebieten zu einem ähnlich hohen Prozent-

satz mit den Typisierphagen reagieren. Das Lysotypieschema sollte nicht beschränkt sein auf ein Stammkollektiv mit lediglich lokaler epidemiologischer Bedeutung.

Betrachtet man die Typisierbarkeit getrennt nach einzelnen Herkunftsgebieten (Tabelle 4, S. 33), so bewegt sie sich zwischen 73,8 % (Denver) und 100 % (Essen). Dabei werden nur Stammgruppen mit mehr als 10 Vertretern berücksichtigt. Für kleinere Stammkollektive erscheint uns eine Aussage nicht berechtigt. Die Typisierbarkeit ist gemäß der Tabelle 4 mit Ausnahme von Proteus rettgeri DENVER in etwa gleich hoch. Das stellt die Allgemeingültigkeit des Phagentypisierschemas unter Beweis.

Ein wichtiges Kriterium für eine Typisiermethode ist neben dem Prozentsatz der erfaßbaren Stämme die Anzahl der Typen, in welche diese klassifiziert werden können, sowie die Gleichmäßigkeit der Klassengrößen.

Die von uns untersuchte Sammlung von Proteus rettgeri Isolierungen läßt sich mit dem Hauptgruppenphagensatz in 21 Haupttypen und mit allen Phagen in insgesamt 93 Typen einteilen. Die Anzahl der möglichen Typen ist mathematisch begrenzt durch die Zahl der Phagen (Anzahl = $2^{\text{Phagenzahl}}-1$). Die theoretische Maximalzahl von Typen ist also bei weitem noch nicht erreicht. Bei der Lysotypie weiterer Stämme muß mit neuen, bisher noch nicht aufgetretenen Lysotypen gerechnet werden.

Ein Typisierschema ist von geringem Wert, wenn der größte Teil der untersuchten Stämme in denselben Typ fällt. In diesem Fall werden durch die Typisiermethode nicht stammesspezifische Eigenschaften der Isolate erfaßt, sondern nur generelle artspezifische Merkmale.

Wie aus Tabelle 3 (S. 30) zu entnehmen ist, treten in unserem Stammkollektiv 93 verschiedene Typen auf. 86 davon sind mit nicht mehr als höchstens drei Stämmen besetzt. Von den verbleibenden 7 Typen fallen insbesondere drei auf - 2A, 234A und 12345B - die, wie der Tabelle zu entnehmen ist, 53 (15,5 %), 48 (14,0 %) bzw. 23 (6,7 %) Stämme enthalten. Alle übrigen Typen umfassen nicht mehr als 16 Stämme.

Hier stellt sich die Frage nach der Ursache für eine so auffällige Häufung von Stämmen in wenigen Typen.

Man kann, wenn bei einer Klassifizierung unverhältnismäßig große Klassen auftreten, grundsätzlich zwei Gründe dafür abwägen:

1. das Auflösungsvermögen des Typisierschemas ist gering, d.h., der Phagensatz ist nicht geeignet, Bakterienstämme weit genug in Klassen zu differenzieren; die Phagen des gewählten Satzes erfassen nicht die stammspezifischen, unterschiedlichen Merkmale nicht-identischer Erreger.

2. das Auflösungsvermögen des Typisierschemas ist ausreichend, das typisierte Stammaterial enthält jedoch tatsächlich identische Stämme, Kopien eines gemeinsamen Ausgangsstammes, die aufgrund epidemiologischer Ausbreitung per Kreuzinfektion in verschiedene Patienten gelangten.

Betrachtet man nur die Lysotypen der häufigsten Klassen genauer, so läßt sich feststellen, daß zu ihrer Abgrenzung verschieden viele Phagen positiv reagieren. Man kann also nicht einen oder zwei besonders unspezifische Phagen mit extrem breiten Wirtsbereich für die großen Klassen verantwortlich machen, zumal bei einem der häufigen Typen (12345B) alle Hauptgruppenphagen und ein Nebengruppenphage (m297) lysieren. Da die übrigen Bakterien in kleine, häufig mit nur einem Stamm besetzte Haupttypen, unterteilt werden, ist es unwahrscheinlich, daß alle Hauptgruppenphagen unspezifisch sind.

Bakterienstämme, die den häufigen Typen angehören, können überwiegend Proteus rettgeri München zugeordnet werden (Tab. 5 S. 37).

Tabelle 5: HERKUNFT DER STÄMME DER HÄUFIGSTEN TYPEN

Typ	Pr.rett. MÜNCHEN	Pr.rett. ESSEN	Pr.rett. HONGKONG	Pr.rett. WEINGART.	Pr.rett. BRISTOL	Pr.rett. DÜSSELDORF
2 A	43	1	7	2	-	-
234 A	47	-	-	-	1	-
12345 B	22	-	-	-	-	1

Auf die häufigsten Klassen entfallen 30 %, 32,6 % und 15,3 % der in München isolierten Rettgeristämme. Dies legt die Vermutung nahe, daß es sich bei dem Münchner Stammkollektiv um epidemiologisch verwandte oder identische Erreger handelt, wie bereits an anderen Stellen vermutet wurde (5, 6). Wir versuchten, diese Tatsache zu erhärten, da sie auch für die Qualität des Lysotypieschemas von Wichtigkeit ist.

Ein Weg identische oder sehr nahe verwandte Stämme aufzufinden, ist ihr Vergleich in verschiedenen, voneinander unabhängigen Merkmalen. Das gleiche Prinzip wird zur Typidentifizierung von pathogenen Keimen für epidemiologische Aussagen, also in der Hauptsache zum Nachweis von Kreuzinfektionen, angewandt. Für Proteus rettgeri sind verschiedene Charakterisierungsmöglichkeiten bekannt:

1 - biochemische fermentative Leistungen
2 - Resistenzverhalten
3 - Serologie
4 - Bakteriozinsynthese
5 - Bakteriozinempfindlichkeit

Die Unterteilung in Gruppen gleichen Biotyps erlaubt eine nur grobe Aufgliederung der Stämme, da große Gruppen entstehen.

Die Antibiotikaempfindlichkeit ist als Marker insofern nur bedingt geeignet, da das Spektrum des Antibiogramms bestimmt wird von den in der jeweiligen Klinik üblichen Gebräuchen im Antibiotikaeinsatz, also lokalen Gegebenheiten. Zudem können Resistenzmarker im Verlauf einer Epidemie durch Plasmidtransfer erworben oder durch Plasmidverlust verloren gehen.

Serotypisierung war zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit nicht bis zur praktischen Verwendbarkeit ausgearbeitet (15).

Die hier erstellte Typisiermöglichkeit für Proteus rettgeri ist einfach und teilweise mechanisierbar, so daß auch eine breite Durchführung möglich ist. Daneben ermöglicht sie eine sehr gute Aufgliederung der Stämme in Untergruppen.

Von den phagentypisierten Rettgeristämmen waren neben dem Lysotyp auch der Biotyp, die Bakteriozinsensitivität und die Bakteriozinogenie bekannt (8, 9). Diese verschiedenen Marker legten wir der Suche nach eventuell vorhandenen identischen Stämmen zugrunde. Resistenztyp und Serotyp wurden aus den angeführten Gründen nicht dazu herangezogen.

Diejenigen Stämme, welche in allen vier Markern übereinstimmen, betrachten wir als Kopien eines Ausgangsstammes, der durch Kreuzinfektion verbreitet wurde. Da eine Übertragung von Erregern aus verschiedenen geographischen Regionen - auch wegen des unterschiedlichen Isolierungszeitraumes - sehr unwahrscheinlich ist, suchten wir nur innerhalb der einzelnen regionalen Stammkollektive nach identischen Stämmen. Dabei erhielten wir die Ergebnisse der Tabelle 6 (S. 39/40).

Tabelle 6: KOPIESTÄMME IM STAMMKOLLEKTIV

Prot.rett.	Lysotyp	identische Stämme
MÜNCHEN	2 A	28, 31, 46, 108, 117, 129, 133 , 137 , 248, 311, 354
		52, 57, 66, 158 , 165, 180, 238 , 315, 316
		20, 87
		274, 297
		96, 152
	234 A	126, 173 , 219, 222 , 231, 347 , 358
		79, 86, 196, 206, 233 , 352
		17, 62, 312
		6, 141, 261
		156, 172, 289
		24, 223

Prot.rett.	Lysotyp	identische Stämme
		244 , 268
		103, 149, 208, 216
	12345B	5, 11, 148, 185, 229, 267, 278, 293 , 298, 325, 360
		195, 277, 362
	Ø	134, 214
		155, 375
DENVER	1 A	21, 24
	5 A	35, 39
	15A	33, 40
	134	20, 22
	Ø	7, 10
		16, 42
HONGKONG	2 A	7, 23
	2 C	11, 24
	15A	9, 21
WEINGARTEN	1 B	2, 15, 31, 32
JAPAN	145B	52, 55

Es wird deutlich, daß bei Proteus rettgeri München eine auffallend große Zahl von Stämmen übereinstimmende Marker aufweist. Demnach handelt es sich hier um durch Kreuzinfektionen verbreitete Kopien eines Erregerstammes. Bei den übrigen geographisch einheitlichen Rettgerigruppen findet man nur sehr sporadisch Stämme mit gleichen Markern.

Daraus geht dreierlei hervor:

1) In den Münchner Kliniken fand zwischen April 1968 und Februar 1974 eine epidemiologische Ausbreitung von Proteus rettgeri Stämmen als Erreger von Harnwegsinfekten statt.

2) Für die Beurteilung des Lysotypiesystems muß das Stammkollektiv von identischen Stämmen bereinigt werden. Beläßt man nur je einen Stamm als Vertreter der einzelnen Gruppen von markergleichen Stämmen, erhält man folgendes Bild:

   Von der Gesamtstammzahl von 273 Isolaten können mit den Hauptgruppenphagen 232 Stämme typisiert werden (85,0 %). Mit allen 16 Phagen lassen sich 238 Stämme (87,2 %) erfassen. Nicht typisierbar bleiben demnach 12,8 %.

   Die Verteilung der Stämme auf die einzelnen Typen ist der Tabelle 7 (S. 42) zu entnehmen.

   Die Änderungen infolge Kopienausschluß betreffen in der Hauptsache die großen Typklassen. Der Anteil der Stämme an den beiden größten Typen verringerte sich um mehr als 4 %. Damit umfaßt die größte Klasse nur mehr 11,4 %. Durch den Wegfall der Stammkopien wurde zwar die Typisierbarkeit insgesamt geringfügig herabgesetzt, dafür aber die Gruppengröße auf eine epidemiologisch akzeptable reduziert.

Tabelle 7: HÄUFIGKEIT DER HAUPT- UND SUBTYPEN NACH AUSSCHLUSS VON STAMMKOPIEN

HAUPTTYP	STAMMZAHL	% v. 273	STAMMZAHLEN DER SUBTYPEN														
			A	B	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	O	P
0	6	2,20	1	1	2	1	1										
1	46	16,85	11	13	3	1	1	1	2	2	2	2	2	1	1	1	3
2	34	12,45	31	1	2												
4	3	1,10	3														
5	16	5,86	12	1	1	1	1										
12	5	1,83	2	1	1	1											
15	29	10,62	14	1	1	3	1	1	1	2	1	1	1	1	1		
34	3	1,10	3														
14	2	0,73	1	1													
24	1	0,37	1														
125	14	5,13	1	2	2	2	1	1	1	1	2	1					
134	1	0,37	1														
135	1	0,37	1														
145	3	1,10	2	1													
234	29	10,62	26	2	1												
1234	14	5,13	2	1	2	1	2	2	3	1							
1235	1	0,37	1														
1245	1	0,37	1														
1345	5	1,83	1	1	1	1	1										
2345	1	0,37	1														
12345	23	8,43	1	11	1	1	2	2	1	2	1	1					
	238	87,20															
nicht typ.	35	12,80															
	273	100,00															

3) Klassifizierung nach nur einem Merkmal allein ist für epidemiologische Analyse nicht hinreichend. Von einem Typisierprinzip wird immer nur eine Eigenschaft des Bakteriums untersucht, seien es Oberflächenrezeptoren oder bestimmte Stoffwechselprodukte. Zwei verschiedene Bakterienstämme können sich in diesem Teilbereich zwar völlig gleichen, dafür aber an anderer Stelle Unterschiede aufweisen. Aus diesem Grund muß z.B. die Zugehörigkeit zum gleichen Lysotyp nicht schon Identität der Stämme bedeuten. Das muß durch Übereinstimmung in zusätzlichen Stammerkmalen erhärtet werden. Für eine epidemiologisch relevante Aussage ist deshalb eine Typisierung mit mehreren voneinander unabhängigen Klassifizierungsmethoden erforderlich.

Der Vergleich der verschiedenen epidemiologischen Merkmale für Proteus rettgeri hat gezeigt, daß die gefundenen Lysotypklassen mit anderen Typisierprinzipien weiter unterteilbar sind. Umgekehrt erlaubt der von uns ausgewählte Phagensatz die Subgruppierung von Stämmen mit identischer Bakteriozinogenie oder Bakteriozinsensibilität.

Der eingangs dargestellten Zielsetzung entsprechend wurde in dieser Arbeit ein praktikables Phagentypisiersystem für Proteus rettgeri für mikrobiologisch-epidemiologische Studien von Infektionen mit dieser Spezies erstellt. Mit ihm konnten etwa 88 % von 343 Stämmen aus verschiedenen klinischen Bereichen dreier Kontinente typisiert werden. Die größte Klasse umfaßte nicht mehr als 15,5 % aller untersuchten Stämme.

Durch Kombination mit anderen Typisiermethoden, wie Biochemotypie und Bakteriozinogenie bzw. -sensitivität sind damit die dringend erforderlichen mikrobiologisch-methodischen Voraussetzungen für die exakte Aufklärung der Ausbreitungswege von Stämmen dieser Spezies geschaffen. Damit ist die krankenhaushygienisch bedeutsame Frage nach sporadischem oder epidemischen Charakter von Infektionen mit Proteus rettgeri experimentell möglich geworden.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Mit 16 Bakteriophagen wurde ein Lysotypieschema für Proteus rettgeri aufgestellt. Die Phagen sind unterteilt in 5 Hauptgruppenphagen und 11 Nebengruppenphagen, die jeweils Haupt- bzw. Nebentyp festlegen. Mit diesen Phagen konnten 88,6% von 343 Proteus rettgeri Stämmen aus verschiedenen geographischen Regionen typisiert werden. Es ergaben sich 21 Haupttypen und mit den Subtypen insgesamt 93 verschiedene Lysotypen. Der größte Typ enthielt 15,5% der 343 Rettgeristämme.

Mit dem neuen Lysotypieschema konnten retrospektiv epidemiologische Zusammenhänge bei im Münchener Klinikbereich aufgetretenen Proteus rettgeri Infektionen nachgewiesen werden.

Zur Charakterisierung der fünf Hauptgruppenphagen wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt.

VII. ANHANG

Tabelle 2: Einteilung der Bakterien nach ihren Lysotypen
(nach Häufigkeit der Lysotypen geordnet)

TAB. 2

	b1 1	m103 2	m115 3	m116 4	d15a 5	m64 a	m297 b	e2 c	e8 d	e11a e	e11ß f	j10 g	j38a h	j38ß i	b2 k	h24 l	LYSOTYP entschlüsselt	CODE
M 12		x															2	2-A
M 20		x																
M 28		x																
M 31		x																
M 33		x																
M 43		x																
M 46		x																
M 52		x																
M 57		x																
M 66		x																
M 68		x																
M 72		x																
M 87		x																
M 89		x																
M 96		x																
M 108		x																
M 117		x																
M 129		x																
M 130		x																
M 133		x																
M 135		x																
M 137		x																
M 152		x																
M 153		x																
M 158		x																
M 161		x																
M 165		x																
M 169		x																
M 179		x																

TAB.2

	b1 1	m103 2	m115 3	m116 4	d15a 5	m64 a	m297 b	e2 c	e8 d	e11a e	e11ß f	j10 g	j38a h	j38ß i	b2 k	h24 l	LYSOTYP entschlüsselt	CODE
M 180		x															2	2-A
M 188		x																
M 225		x																
M 230		x																
M 235		x																
M 238		x																
M 248		x																
M 262		x																
M 274		x																
M 297		x																
M 311		x																
M 315		x																
M 316		x																
M 354		x																
E 16		x																
H 4		x																
H 7		x																
H 18		x																
H 23		x																
H 30		x																
H 32		x																
H 33		x																
W 21		x																
W 29		x																

TAB. 2

	b1 1	m103 2	m115 3	m116 4	d15a 5	m64 a	m297 b	e2 c	e8 d	e11a e	e11ß f	j10 g	j38a h	j38ß i	b2 k	h24 l	LYSOTYP entschlüsselt	CODE
M 6		x	x	x													234	234-A
M 8		x	x	x														
M 17		x	x	x														
M 24		x	x	x														
M 48		x	x	x														
M 62		x	x	x														
M 69		x	x	x														
M 79		x	x	x														
M 86		x	x	x														
M 103		x	x	x														
M 126		x	x	x														
M 128		x	x	x														
M 141		x	x	x														
M 149		x	x	x														
M 151		x	x	x														
M 156		x	x	x														
M 172		x	x	x														
M 173		x	x	x														
M 196		x	x	x														
M 203		x	x	x														
M 206		x	x	x														
M 208		x	x	x														
M 209		x	x	x														
M 216		x	x	x														
M 219		x	x	x														
M 222		x	x	x														
M 223		x	x	x														
M 231		x	x	x														
M 233		x	x	x														

TAB. 2

	b1 1	m103 2	m115 3	m116 4	d15a 5	m64 a	m297 b	e2 c	e8 d	e11a e	e11ß f	j10 g	j38a h	j38ß i	b2 k	h24 l	LYSOTYP entschlüsselt	CODE
M 239		x	x	x													234	234-A
M 242		x	x	x														
M 244		x	x	x														
M 261		x	x	x														
M 265		x	x	x														
M 268		x	x	x														
M 289		x	x	x														
M 307		x	x	x														
M 312		x	x	x														
M 313		x	x	x														
M 317		x	x	x														
M 347		x	x	x														
M 352		x	x	x														
M 358		x	x	x														
M 361		x	x	x														
M 363		x	x	x														
M 365		x	x	x														
M 368		x	x	x														
B 3		x	x	x														

TAB. 2

	b1 1	m103 2	m115 3	m116 4	d15a 5	m64 a	m297 b	e2 c	e8 d	e11a 3	e11ß f	j10 g	j38a h	j38ß i	b2 k	h24 l	LYSOTYP entschlüsselt	CODE
M 1	x	x	x	x	x		x										12345-b	12345-B
M 5	x	x	x	x	x		x											
M 11	x	x	x	x	x		x											
M 25	x	x	x	x	x		x											
M 116T	x	x	x	x	x		x											
M 132	x	x	x	x	x		x											
M 148	x	x	x	x	x		x											
M 170	x	x	x	x	x		x											
M 185	x	x	x	x	x		x											
M 195	x	x	x	x	x		x											
M 198	x	x	x	x	x		x											
M 229	x	x	x	x	x		x											
M 267	x	x	x	x	x		x											
M 272	x	x	x	x	x		x											
M 277	x	x	x	x	x		x											
M 278	x	x	x	x	x		x											
M 290	x	x	x	x	x		x											
M 293	x	x	x	x	x		x											
M 298	x	x	x	x	x		x											
M 325	x	x	x	x	x		x											
M 360	x	x	x	x	x		x											
M 362	x	x	x	x	x		x											
R 11	x	x	x	x	x		x											

TAB. 2

	b1 1	m103 2	m115 3	m116 4	d15a 5	m64 a	m297 b	e2 c	e8 d	e11a e	e11ß f	j10 g	j38a h	j38ß i	b2 k	h24 l	LYSOTYP entschlüsselt	CODE
E 1	x							x									1-c	1-B
E 4	x							x										
E 19	x							x										
J 24	x							x										
J 44	x							x										
J 90	x							x										
R 1	x							x										
R 5	x							x										
R 6	x							x										
W 2	x							x										
W 9	x							x										
W 15	x							x										
W 27	x							x										
W 31	x							x										
W 32	x							x										
W 41	x							x										
M 174	x				x												15	15-A
B 5	x				x													
E 10	x				x													
E 17	x				x													

TAB. 2

	b1 1	m103 2	m115 3	m116 4	d15a 5	m64 a	m297 b	e2 c	e8 d	e11a e	e11ß f	j10 g	j38a h	j38ß i	b2 k	h24 l	LYSOTYP entschlüsselt	CODE
D 6	x				x												15	15-A
D 14	x				x													
D 31	x				x													
D 33	x				x													
D 40	x				x													
H 9	x				x													
H 19	x				x													
H 20	x				x													
H 21	x				x													
J 5	x				x													
J 13	x				x													
J 74	x				x													
D 5					x												5	5-A
D 8					x													
D 13					x													
D 17					x													
D 26					x													
D 27					x													
D 30					x													
D 35					x													
D 37					x													
D 38					x													
D 39					x													

TAB. 2

	b1 1	m103 2	m115 3	m116 4	d15a 5	m64 a	m297 b	e2 c	e8 d	e11a e	e11ß f	j10 g	j38a h	j38ß i	b2 k	h24 l	LYSOTYP entschlüsselt	CODE
H 16					x												5	5-A
B 8					x													
M 121	x																1	1-A
M 266	x																	
D 11	x																	
D 21	x																	
D 24	x																	
D 41	x																	
	x																	
B 4	x																	
B 12	x																	
E 3	x																	
E 13	x																	
J 95	x																	
W 42	x																	
W 38	x											x					1-g	1-C
J 23	x											x						
J 36	x											x						

TAB. 2

	b1 1	m103 2	m115 3	m116 4	d15a 5	m64 a	m297 b	e2 c	e8 d	e11a e	e11ß f	j10 g	j38a h	j38ß i	b2 k	h24 l	LYSOTYP entschlüsselt	CODE
E 9	x					x		x	x	x	x	x	x	x			1-acdefghi	1-P
E 11	x					x		x	x	x	x	x	x	x				
R 7	x					x		x	x	x	x	x	x	x				
H 2		x														x	2-l	2-C
H 11		x														x		
H 24		x														x		
M 350				x													4	4-A
W 44				x														
B 6				x														
E 7	x				x											x	15-l	15-D
E 14	x				x											x		
																x		
H 26	x				x													
M 351			x	x													34	34-A
D 23			x	x														
W 8			x	x														

TAB. 2	b1 1	m103 2	m115 3	m116 4	d15a 5	m64 a	m297 b	e2 c	e8 d	e11a e	e11ß f	j10 g	j38a h	j38ß i	b2 k	h24 l	LYSOTYP entschlüsselt	CODE
J 1	x	x	x	x				x	x			x	x		x		1234-cdghk	1234-G
J 67	x	x	x	x				x	x			x	x		x			
H 29	x	x	x	x				x	x			x	x		x			
H 6																x	0-l	0-C
H 31																x		
E 6	x											x			x		1-gk	1-G
J 51	x											x			x			
H 27	x							x	x			x					1-cdg	1-H
H 34	x							x	x			x						
J 4	x							x		x	x						1-cef	1-I
R 4	x							x		x	x							
B 2	x							x				x			x		1-cgk	1-K
W 20	x							x				x			x			

TAB. 2

	b1 1	m103 2	m115 3	m116 4	d15a 5	m64 a	m297 b	e2 c	e8 d	e11a e	e11ß f	j10 g	j38a h	j38ß i	b2 k	h24 l	LYSOTYP entschlüsselt	CODE
E 2	x							x		x	x			x			1-cefi	1-L
E 15	x							x		x	x			x				
M 45	x	x					x										12-b	12-A
M 85	x	x					x											
E 8	x				x			x	x			x					15-cdg	15-H
W 33	x				x			x	x			x						
M 147	x	x			x		x										125-b	125-B
M 192	x	x			x		x											
J 21	x	x			x			x									125-c	125-C
J 75	x	x			x			x										
D 2	x	x			x								x				125-h	125-D
D 25	x	x			x								x					
J 25	x	x			x			x				x			x		125-cgk	125-I
J 32	x	x			x			x				x			x			

TAB. 2

	b1 1	m103 2	m115 3	m116 4	d15a 5	m64 a	m297 b	e2 c	e8 d	e11a e	e11ß f	j10 g	j38a h	j38ß i	b2 k	h24 l	LYSOTYP entschlüsselt	CODE
D 20	x		x	x													134	134-A
D 22	x		x	x														
R 10	x			x	x			x									145-c	145-A
W 46	x			x	x			x										
J 52	x			x	x				x			x			x		145-dgk	145-B
J 55	x			x	x				x			x			x			
M 187		x	x	x			x										234-b	234-B
M 218		x	x	x			x											
W 7	x	x	x	x													1234	1234-A
B 11	x	x	x	x														
W 14	x	x	x	x				x				x			x		1234-cgk	1234-C
J 42	x	x	x	x				x				x			x			
W 1	x	x	x	x				x	x			x			x		1234-cdgk	1234-E
W 4	x	x	x	x				x	x			x			x			

TAB. 2

	b1 1	m103 2	m115 3	m116 4	d15a 5	m64 a	m297 b	e2 c	e8 d	e11a e	e11ß f	j10 g	j38a h	j38ß i	b2 k	h24 l	LYSOTYP entschlüsselt	CODE
B 1	x	x	x	x					x			x	x		x		1234-dghk	1234-F
J 8	x	x	x	x					x			x	x		x			
M 199	x	x	x	x	x			x				x					12345-cg	12345-E
D 34	x	x	x	x	x			x				x						
H 8	x	x	x	x	x							x			x		12345-gk	12345-F
K 3	x	x	x	x	x							x			x			
J 46	x	x	x	x	x				x			x			x		12345-dgk	12345-H
W 26	x	x	x	x	x				x			x			x			
H 12								x									0-c	0-A
W 37												x					0-g	0-B
R 8												x			x		0-gk	0-D

TAB. 2

	b1 1	m103 2	m115 3	m116 4	d15a 5	m64 a	m297 b	e2 c	e8 d	e11a e	e11ß f	j10 g	j38a h	j38ß i	b2 k	h24 l	LYSOTYP entschlüsselt	CODE
R 3										x	x			x			0-efi	0-E
J 57	x							x	x								1-cd	1-D
E 20	x								x			x					1-dg	1-E
J 86	x											x		x			1-gi	1-F
J 91	x							x				x	x	x			1-cghi	1-M
E 18	x							x	x	x	x		x	x			1-cdefhi	1-N
E 5	x					x		x		x	x	x	x	x			1-acefghi	1-0
M 7		x					x										2-b	2-B
W 18					x			x									5-c	5-B
D 18					x								x				5-h	5-C

TAB. 2

	b1 1	m103 2	m115 3	m116 4	d15a 5	m64 a	m297 b	e2 c	e8 d	e11a e	e11ß f	j10 g	j38a h	j38ß i	b2 k	h24 l	LYSOTYP entschlüsselt	CODE
H 15					x											x	5-l	5-D
J 9					x							x		x			5-gi	5-E
J 11	x	x						x									12-c	12-B
H 17	x	x														x	12-l	12-C
ATCC	x	x						x		x	x	x	x	x			12-cefghi	12-D
J 68	x				x			x									15-c	15-B
D 1	x				x								x				15-h	15-C
W 6	x				x			x	x								15-cd	15-E
H 3	x				x				x			x					15-dg	15-F
J 14	x				x							x			x		15-gk	15-G

TAB. 2

	b1 1	m103 2	m115 3	m116 4	d15a 5	m64 a	m297 b	e2 c	e8 d	e11a e	e11ß f	j10 g	j38a h	j38ß i	b2 k	h24 l	LYSOTYP entschlüsselt	CODE
J 22	x				x			x				x			x		15-cgk	15-I
W 17	x				x				x	x				x			15-dei	15-k
J 43	x				x	x				x	x			x			15-aefi	15-L
M 64	x				x	x		x		x	x	x		x			15-acefgi	15-M
W 39	x				x	x		x	x	x	x	x		x	x		15-acdefgik	15-N
R 2	x			x				x	x	x	x			x			14-cdefi	14-A
R 9	x			x		x		x	x	x	x	x		x			14-acdefgi	14-B
VARIA		x		x													24	24-A
H 25	x	x			x												125	125-A
H 14	x	x			x											x	125-l	125-E

TAB. 2

	b1 1	m103 2	m115 3	m116 4	d15a 5	m64 a	m297 b	e2 c	e8 d	e11a e	e11ß f	j10 g	j38a h	j38ß i	b2 k	h24 l	LYSOTYP entschlüsselt	CODE
W 11	x	x			x		x	x									125-bc	125-F
D 28	x	x			x		x						x				125-bh	125-G
J 90	x	x			x			x	x	x							125-cde	125-H
H 28	x	x			x			x	x			x			x		125-cdgk	125-K
J 3	x		x		x			x									135-c	135-A
W 16		x	x	x				x				x			x		234-cgk	234-C
M 280	x	x	x	x			x										1234-b	1234-B
W 3	x	x	x	x					x			x			x		1234-dgk	1234-D
E 12	x	x	x	x				x	x			x		x	x		1234-cdgik	1234-H
M 359	x	x	x		x		x										1235-b	1235-A

TAB. 2

	b1 1	m103 2	m115 3	m116 4	d15a 5	m64 a	m297 b	e2 c	e8 d	e11a e	e11ß f	j10 g	j38a h	j38ß i	b2 k	h24 l	LYSOTYP entschlüsselt	CODE
J 56	x	x		x	x			x									1245-c	1245-A
D 32	x		x	x	x												1345	1345-A
H 5	x		x	x	x							x					1345-g	1345-B
H 1	x		x	x	x							x			x		1345-gk	1345-C
W 36	x		x	x	x			x	x			x			x		1345-cdgk	1345-D
H 10	x		x	x	x	x		x		x	x	x	x	x			1345-acefghi	1345-E
J 45		x	x	x	x							x			x		2345-gk	2345-A
M 256	x	x	x	x	x												12345	12345-A
D 29	x	x	x	x	x			x									12345-c	12345-C
M 252	x	x	x	x	x		x						x				12345-bh	12345-D

TAB. 2

	b1 1	m103 2	m115 3	m116 4	d15a 5	m64 a	m297 b	e2 c	e8 d	e11a e	e11ß f	j10 g	j38a h	j38ß i	b2 k	h24 l	LYSOTYP entschlüsselt	CODE
J 87	x	x	x	x	x			x				x			x		12345-cgk	12345-G
J 10	x	x	x	x	x						x	x	x	x	x		12345-fghik	12345-I
J 38	x	x	x	x	x			x	x	x	x	x	x	x	x		12345-cdefghik	12345-K

VIII. ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE DARSTELLUNG DER FÜNF HAUTGRUPPENPHAGEN

Die elektronenoptischen Aufnahmen wurden an der Universitäts-Augenklinik in München gefertigt (Elektronenmikroskop EM 10, Zeiss). Herrn Professor Dr. M. Theopold und Fräulein Scheler danken wir für die Unterstützung.

MORPHOLOGIE DER PHAGEN

Phage	Kopf	Schwanz	Schwanzfibern	Endplatte
b 1	106x77	91	keine	vorhanden
m 103	57x49	177	keine	keine
m 115	51x43	180	keine	keine
m 116	54x46	183	keine	keine
d 15a	120x109	171	vorhanden	vorhanden

(Längenangaben in Nanometer)

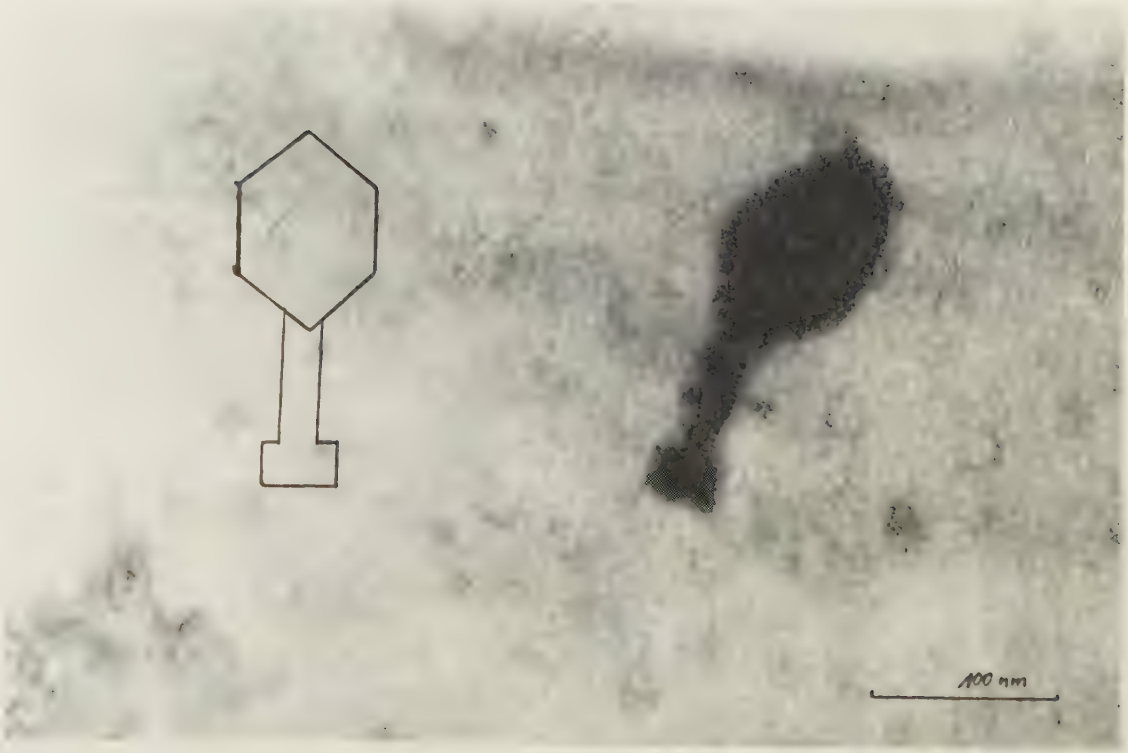

Abb. 1: Phage b 1 Vergrößerung 350.000 fach

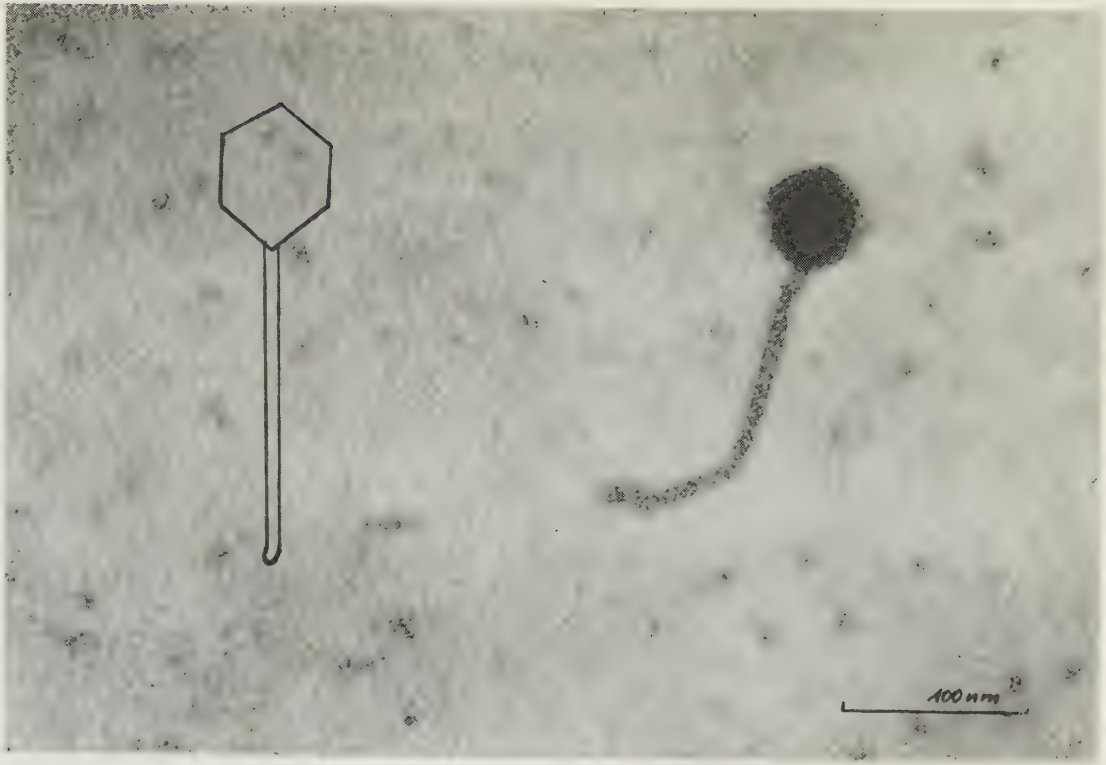

Abb. 2: Phage m 103 Vergrößerung 350.000 fach

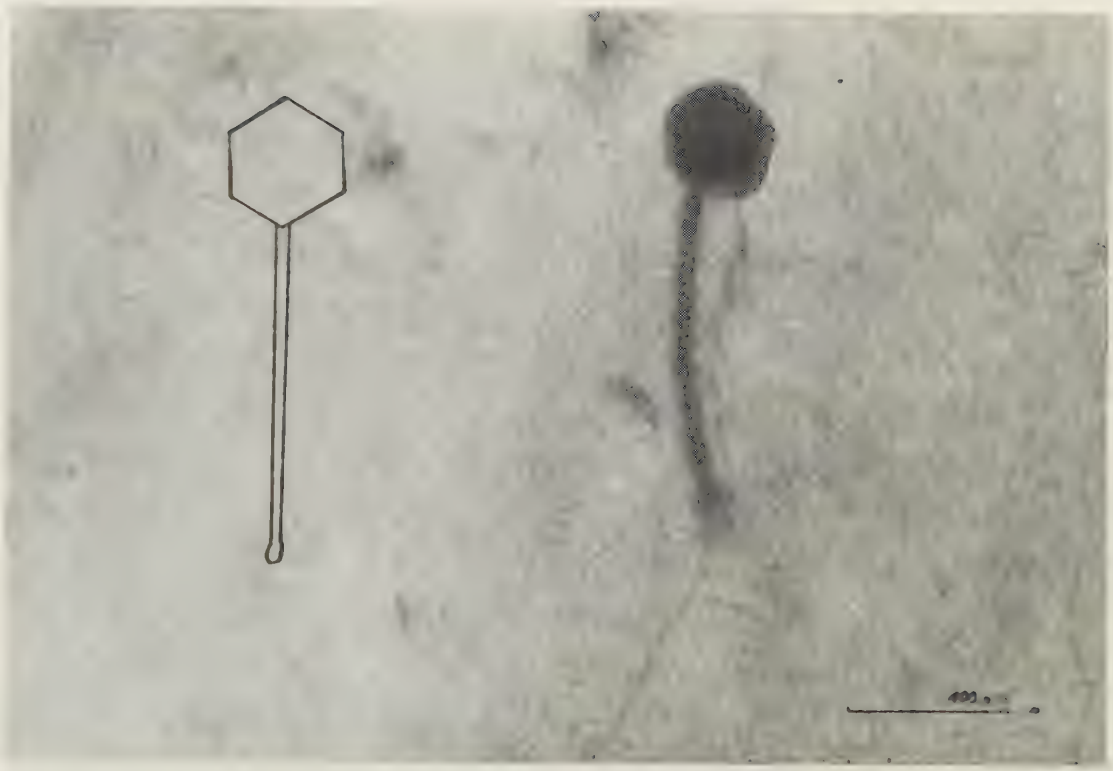

Abb. 3: Phage m 115 Vergrößerung 350.000 fach

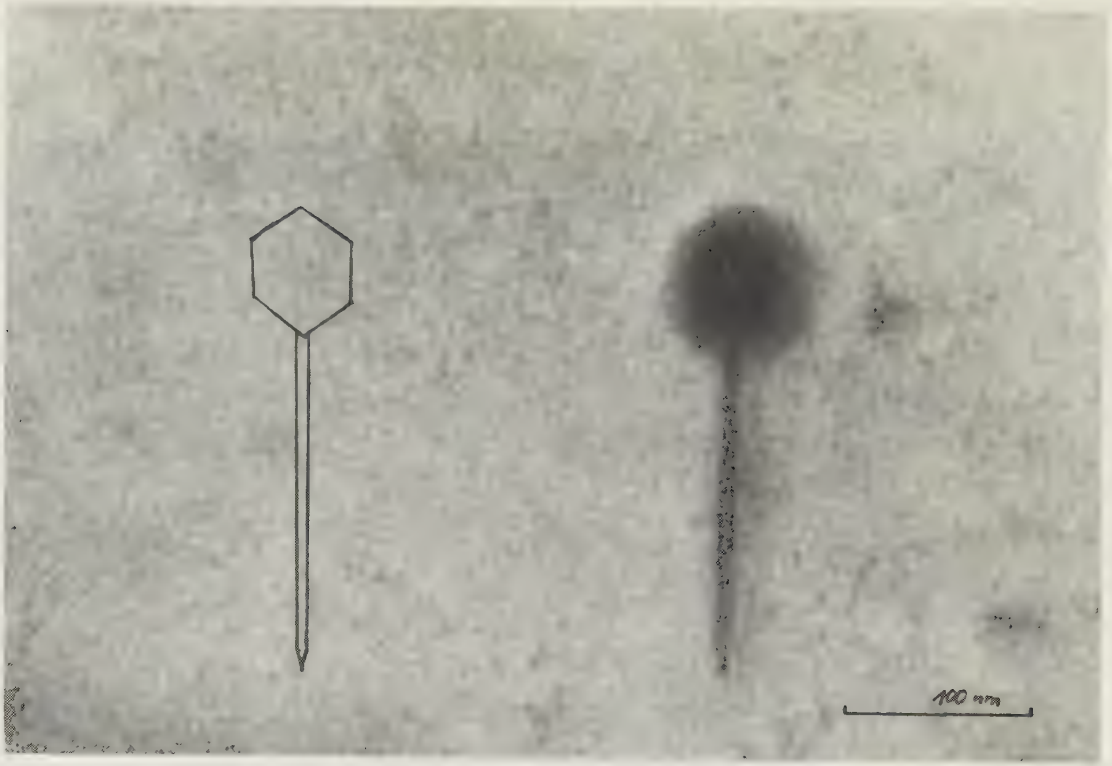

Abb. 4: Phage m 116 Vergrößerung 350.000 fach

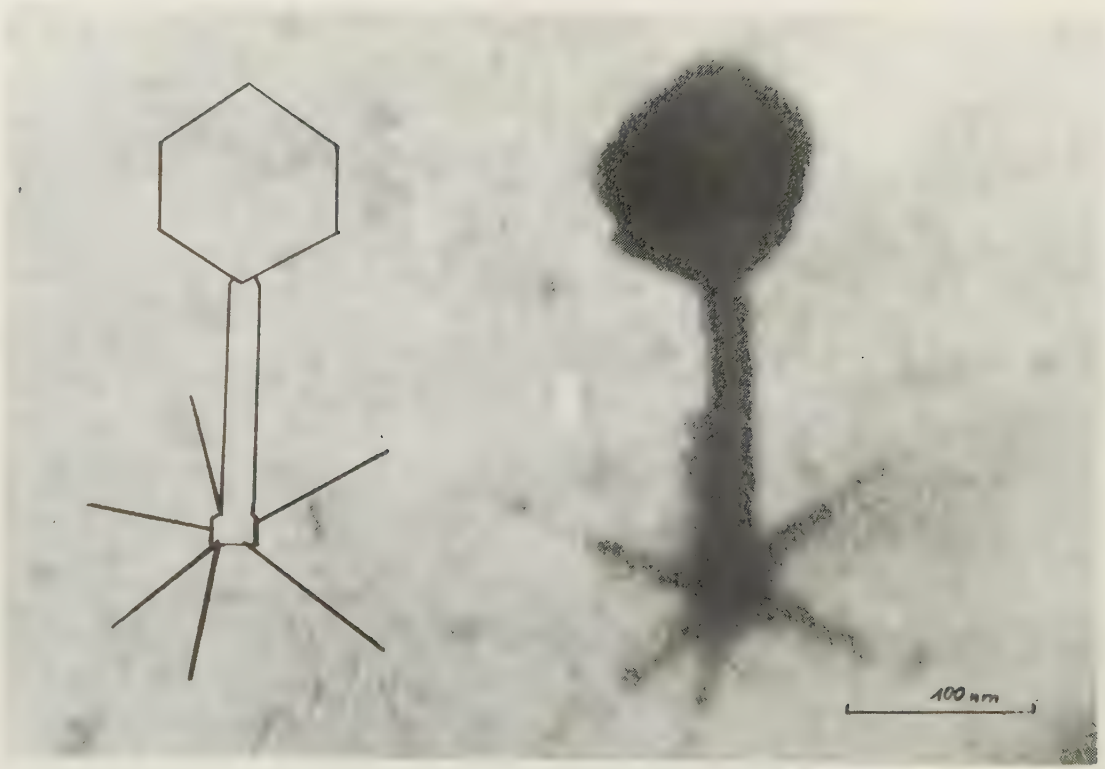

Abb. 5: Phage d 15a Vergrößerung 350.000 fach

IX. LITERATURVERZEICHNIS

1. Adams, M.H.: Bacteriophages. Interscience Publishers Inc., New York, 1959

2. Anderson, E.S. und Williams, R.E.O.: Bacteriophage typing of enteric pathogens and Staphylococci and its use in epidemiology. J.Clin.Path. 9 (1956), 94 - 115

3. Anderson, R.L. und Engley, F.B.: Typing methods for Proteus rettgeri. J.Clin. Microbiol. 8 (1978), 715 - 724

4. Bauernfeind, A. und Haupt, S.: Erregerspektrum bei Bakteriurien männlicher und weiblicher erwachsener Patienten. Urologe A 11. Jg. (1972), Heft 2, 90-94

5. Bauernfeind, A.: Kreuzinfektionen der Harnwege durch einen neuen Typ von Proteus rettgeri. Habilitationsschrift, München, 1973

6. Bauernfeind, A.: Anreicherung chemotherapieresistenter Hospitalkeime durch Desinfektion. Münch.med. Wschr. 118 (1976) Nr. 27, 871 - 874

7. Bauernfeind, A. und Wiersma, G.: Nosokomiale Infektionen des Harnsystems mit Proteus rettgeri. Immunität und Infektion 4 (1977), 138 - 141

8. Bauernfeind, A. und Festl, R.: Lysotypie bei Proteus rettgeri. 37. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, Berlin 1979

9. Bauernfeind, A.: unveröffentlichte Ergebnisse

10. Blair, J.E. und Carr, E.: The bacteriophage typing of Staphylococci. J.Inf.Dis. 93 (1953), 1 - 13

11. Center for Disease Control: National nosocomial infections study quarterly report, fourth quater. Center of Disease Control, Atlanta, 1973, 5-12, 29-31

12. Edwards, L.D. Cross, A., Levin, S. und Landau, W.: Outbreak of a nosocomial infection with a strain of Proteus rettgeri resistant to many antimicorbials. Am. J. Clin. Path 61 (1974), 41 - 46

13. Edwards, P.R. und Ewing, W.H.: Indentification of the Enterobacteriaceae. Publishing Co., Minneapolis, 1972

14. Eyer, H.: Der Hospitalismus und seine Bekämpfung. Münch.med.Wschr. 44 (1958), 1957 - 1958

15. France, D.R. und Markham, N.P.: Epidemiological aspects of Proteus infections with particular reference to phage typing. J.Clin.Path. 21 (1968), 97 - 102

16. Gross, R. und Schölmerich, P.: Lehrbuch der Inneren Medizin. Schattauer Verlag, Stuttgart, 1976

17. Heberer, G., Köle, W. und Tscherne, H.: Chirurgie. Springer - Verlag, Heidelberg, 1977

18. Huang, C.T. und Chou, G.: Drug sensitivity of Proteus species. J.Clin.Path. 21 (1968), 103 - 106

19. Iannini, P.B., Eickhoff, T.C. und LaForce, F.M.: Multidrug-resistant Proteus rettgeri: an emerging problem. Ann.Int.Med. 85 (1976), 161 - 164

20. Jawetz, E., Melnick, J.L. und Adelberg, E.A.: Medizinische Mikrobiologie. Springer - Verlag, Heidelberg, 1977

21. Kaslow, R.A., Lindsey, J.O., Bisno, A.L. und Price, A.: Nosocomial infection with highly resistant Proteus rettgeri. Am.J.Epidemiol. 104 (1976), Nr. 3, 278 - 286

22. Kass,, E.H. und Schneiderman, L.J.: Entry of bacteria into the urinary tracts of patients with inlying catheters. New Eng. J.Med. 256 (1957), Nr. 12, 556 - 557

23. Lindsey, J.O., Martin, W.T., Sonnenwirth, A.C. und Bennett, J.V.: An outbreak of nosocomial Proteus rettgeri urinary tract infection. Am.J.Epidemiol. 103 (1976), Nr. 3, 261 - 269

24. MacDonald, R.A., Levitin, H., Mallory, K. und Kass, E.H.: Relations between pyelonephritis and bacterial counts in the urine. New Eng. J. Med. 256 (1957), Nr. 20, 915-922

25. Naumann, P. und Hubmann, R.: Zur antibakteriellen Therapie urologischer Infektionen. Urologe 7.Jg. (1968) Heft 1, 16 - 23

26. Omland, T.: Nosocomial urinary tract infections caused by Proteus rettgeri. Acta path. microbiol. Scand. 48 (1960), 221 - 229

27. Pruneda, R.C. und Farmer, J.J.: Bacteriophage typing of Shigella sonnei. J.Clin.Microbiol. 5 (1977), Nr. 1 66 - 74

28. Richard, C., Popoff, M. und Prats Pastor, G.: Bacteriological study of hospital urinary infections due to Proteus rettgeri fermenting lactose. Ann.Biol. Clin. 32 (1974), 2, 149 - 154

29. Rische, H.: Lysotypie und andere spezielle epidemiologische Laboratoriumsmethoden. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1973

30. Schmiedt, E. und Hofstetter, A.: Der infektiöse Hospitalismus in der Urologie. Münch.med.Wschr. 115 (1973) Nr.7, 259 - 264

31. Skahan, J.M. und Parisi, J.T.: Development of a bacteriophage typing set for Staphylococci epidermidis. J.Clin.Microbiol. 6 (1977), Nr. 1, 16 - 18

32. Swanstroem, M. und Adams, M.H.: Agar layer method for production of high titre phage stocks. Proc.Soc.Exp. Biol. Med. 78 (1951), 372 - 375

33. Traub, W.H., Craddock, M.E., Raymond, E.A. et al.: Characterization of an unusual strain of Proteus rettgeri associated with an outbreak of nosocomial urinary tract infection. Appl. Microbiol. 22 (1971), 3, 278 - 283

34. Washington, J.A., Senjem, D.H., Halderson, A., Schutt, A.H. und Martin, W.J.: Nosocomially aquired bacteriuria due to Proteus rettgeri and Providencia stuartii. Am.J.Clin.Path. 60 (1973), 836 - 838.

Lebenslauf

Am 22.August 1955 wurde ich, Rosemarie Festl, als Tochter des kaufmännischen Angestellten Ludwig Festl und der Studentin der Zahnmedizin Rosemarie Festl in München geboren.

1961 - 1965	besuchte ich die Turnerschule in Waldtrudering.
1965	wechselte ich über zum Gymnasium Grafing. Dort absolvierte ich den mathematisch - naturwissenschaftlichen Zweig der Schule. Als Fremdsprachen lernte ich Englisch und Latein.
1974	bestand ich das Abitur mit einem Notendurchschnitt von 1,2.
Juli/Aug. 1974	Ausbildung zur Schwesternhelferin durch den Malteser - Hilfsdienst.
Nov. 1974	Zum Wintersemester 74/75 immatrikulierte ich mich an der Ludwig - Maximilians - Universität in München für das Fach Humanmedizin.
Aug. 1976	Nach vier vorklinischen Semestern legte ich im August 1976 die Ärztliche Vorprüfung und
Aug. 1977	im August 1977 den ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung ab.
Aug. 1979	Bestehen des zweiten Abschnittes der Ärztlichen Prüfung.
Okt./Nov. 1980	Bestehen des dritten Abschnittes der Ärztlichen Prüfung.
3. Dez. 1980	Erhalt der Approbation als Arzt.